

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/093173 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/573,
C12N 9/12, C07K 16/40, C12N 15/85

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/05234

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Mai 2002 (13.05.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 23 055.9 11. Mai 2001 (11.05.2001) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): GRÜNENTHAL GMBH [DE/DE]; Zieglerstrasse 6, 52078 Aachen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): WEIHE, Eberhard [DE/DE]; Am Grassenberg 7 a, 35037 Marburg (DE). SCHÄFER, Martin, K.-H. [DE/DE]; Unter dem Gedankenspiel 48, 35041 Marburg (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/093173 A2

(54) Title: SCREENING METHOD USING PIM1-KINASE OR PIM3-KINASE

(54) Bezeichnung: SCREENINGVERFAHREN MIT PIM1-KINASE ODER PIM3-KINASE

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting pain-associated substances using PIM1-kinase or PIM 3-kinase and the use of thus identified compounds, in addition to antibodies and anti-sense nucleotides against PIM1-kinase or PIM-3-kinase in medicaments and diagnostic agents and in pain therapy.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung schmerzrelevanter Substanzen unter Verwendung der PIM-1- oder PIM-3-Kinase und die Verwendung dadurch identifizierter Verbindungen sowie Antikörper und Antisensenukleotiden gegen PIM-1- oder PIM-3-Kinase in Arzneimitteln und Diagnostika sowie in der Schmerztherapie.

BEST AVAILABLE COPY

Patentanmeldung der Grünenthal GmbH, D-52078 Aachen
(eigenes Zeichen: G 3064)

Screeningverfahren mit PIM1-Kinase oder PIM3-Kinase

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung schmerzrelevanter Substanzen unter Verwendung der PIM-1- oder PIM-3-Kinase und die Verwendung dadurch identifizierter Verbindungen sowie Antikörper und Antisensenukleotiden gegen PIM-1- oder PIM-3-Kinase in Arzneimitteln und Diagnostika sowie in der Schmerztherapie.

10

Zur Therapie von Schmerzen stehen unterschiedliche Arzneimittel zur Verfügung wie z.B. Acetylsalicylsäure, Paracetamol, Dipyron, Tramadol, Morphin und Fentanyl; aber auch Substanzen wie Amitryptilin und Ketamin kommen zur Behandlung von Schmerzpatienten zum Einsatz. Trotz zunehmend verfeinerter Therapieschemata kann jedoch insbesondere bei chronischen Schmerzzuständen oft keine dauerhafte Verbesserung für die Patienten erzielt werden. Hierfür ist unter anderem auch die Tatsache verantwortlich, daß es beim chronischen Schmerz zu dauerhaften Veränderungen beteiligter Nervenzellen kommt.

15

20

Die Schmerzforschung der letzten Jahre erbrachte die grundlegende Erkenntnis, daß der Entwicklung gerade chronischer Schmerzzustände plastische Veränderungen des Nervensystems, insbesondere in den nozizeptiven Neuronen der Hinterwurzelganglien und der Neurone im Bereich der Dorsalhörner des Rückenmarks, zugrunde liegen (als Überblick siehe: Coderre et al. 1993; Zimmermann & Herdegen, 1996). Die neuronale Plastizität geht einher mit Veränderungen in der Expression bestimmter Gene und führt zur langanhaltenden Veränderung des Phänotyps der betroffenen Neuronen. Das Konzept der neuronalen Plastizität wurde bisher vor allem auf Entwicklungs-, Lern- und Regenerationsprozesse angewandt, doch die neueren Befunde aus

25

30

der Schmerzforschung zeigen, daß dieses Konzept auch bei pathophysiologischen Vorgängen greift (Tölle, 1997).

5 Die Chronifizierung des Schmerzes ist tierexperimentell auf phänomenologischer Ebene bereits relativ gut charakterisiert. Die Induktion chronischer Schmerzzustände führt zu folgenden Veränderungen:

- Erhöhte Empfindlichkeit und verringerte Reizschwelle peripherer Nozizeptoren
- Aktivierung sogenannter stiller Nozizeptoren
- 10 • Reorganisation rezeptiver Felder
- Erregbarkeitszunahme im Rückenmark.

15 Diese plastischen Veränderungen sind sowohl für die in den Ganglien vorkommenden primären Afferenzen, als auch für die im Rückenmark lokalisierten nachgeschalteten Neurone beschrieben worden und werden auch supraspinal z. B. im Thalamus vermutet. In Analogie zu den für Lern- und Gedächtnisprozesse beschriebenen Mechanismen ist anzunehmen, daß in den beteiligten Zellen ein spezifisches Genprogramm abläuft, das die koordinierte Regulation relevanter Gene beinhaltet, deren Expression
20 dann maßgeblich zur pathophysiologischen Ausprägung chronischer Schmerzen beiträgt.

Ausgangspunkt der Erfindung war daher die Identifizierung derartiger schmerzregulierter Gene, die in ihrer Expression unter
25 Schmerzbedingungen verändert und deshalb wahrscheinlich an der Entstehung und Verarbeitung von insbesondere chronischen Schmerzen beteiligt sind, über ihre Regulationszusammenhänge.

Für eine Reihe bekannter Gene wurde bereits eine Regulation in

verschiedenen Schmerzmodellen nachgewiesen (s. Tabelle 1), so zum Beispiel für Neurotransmitter (Substanz P, CGRP), Rezeptoren (Substanz P-Rezeptor, μ , κ , δ -Opiatrezeptoren, NMDA-Rezeptor) und Transkriptionsfaktoren (cJun, JunB, cFos oder Krox24). Die Tatsache, daß

5 die genannten Rezeptoren bereits als molekulare Targets für die Entwicklung neuer Analgetika verwendet werden (Dickenson, 1995), gibt einen deutlichen Hinweis darauf, daß auch die Identifizierung neuer schmerzregulierter Gene für die Entwicklung von Analgetika, insbesondere für entsprechende Screeningverfahren, von großem Interesse ist. Die

10 zentrale Idee ist hierbei, die Entstehung oder Persistenz von Schmerzen, insbesondere chronischer Art, zu unterbrechen, indem solche Proteine in ihrer Funktion beeinflußt werden, die in Schmerz-Zuständen verstärkt oder vermindert gebildet werden.

Tabelle 1: Regulation bekannter Gene/Genprodukte in Schmerz-Tiermodellen

Gen(produkt)	Reg	Gewebe/Zelle	Modell	Literatur
(a) Neurotransmitter				
CGRP	↑	RM-Dorsalhorn	UV-Bestrahlung der Haut	Gillardon F et al. (1992) Ann NY Acad Sci 657: 493-96
Preprotachykinin & CGRP-mRNA	↑	DRG	Monoarthritis	Donaldson LF et al. (1992) Mol Brain Res 16: 143-49
Preprotachykinin -mRNA	↑	RM-Dorsalhorn	Formalin	Noguchi & Ruda (1992) J Neurosci 12:2563-72
Prodynorphin mRNA	↑	Rückenmark	Exp Arthritis	Höller et al (1987) Neurosci Lett 96:247-52
Dynorphin Prot.	↑	Rückenmark	Formalin	Ruda et al. (1988) PNAS 85: 622-26
Substanz P	↑	Nozizeptoren	Exp. Arthritis	Levine JD et al. (1984) Science 226:547-49
(b) Neurotrophine				
BDNF mRNA & Immunreaktivität	↑	DRG: trkA+ Zellen	i. th. NGF Inj.	Michael GC et al. (1997) J Neurosci 17: 8476-90
(c) Rezeptoren				
μ, κ, δ-Bindung	↓ ↑	RM-Dorsalhorn	Monoarthritis	Besse D et al. (1992) Eur J Pharmacol 223:123-31
μ-Opiatrezeptor-Immunreaktivität	↑	DRG	Carageenan ind. Entzündung	Ji R-R et al. (1995) J Neurosci 15: 8156-66
κ & δ-Opiatrez.-mRNA	↓	DRG	Carageenan ind. Entzündung	Ji R-R et al. (1995) J Neurosci 15: 8156-66
κ & μ-Opiatrezeptor-mRNA	↑	RM-Dorsalhorn	Monoarthritis	Maekawa K et al. (1995) Pain 64:365-71
CCK ₈ -Rez. mRNA	↑	DRG	Axotomie	Zhang X et al. (1993) Neuroscience 57: 227-233
NMDA-R1-mRNA	↓	RM-Dorsalhorn Laminae I & II	CFA-Induzierte Entzündung	Kus L et al. (1995) Neuroscience 68: 159-65
(d) Enzyme				
NADPH-Diaphorase Aktivität	↑	RM-Dorsalhorn	Ischiaticus-Transektion	Fiallos-Estrada et al. ('93) Neurosci Lett 150: 169-73
NADPH-Diaphorase	↑	Rückenmark	Formalin	Solodkin et al. 1992 Neurosci 51: 495-99
NO-Synthetase mRNA	↑	DRG	Axotomie	Verge VMK et al. (1992) PNAS 89: 11617-62
NO-Synthetase Protein	↑	RM-Dorsalhorn	Formalin	Herdegen et al. (1994) Mol Brain Res 22:245-58
NO-Synthetase-Immunreaktivität	↑	DRG	Ischiaticus-Transektion	Fiallos-Estrada et al. ('93) Neurosci Lett 150: 169-73
(e) Signalkaskade				
rap1A, rap1B, H-ras mRNA	↑	Rückenmark	Formalin	Urayama O et al. (1997) Mol Brain Res 45:331-34
PKC-Bindung	↑	RM-Dorsalhorn	CFA-induzierte Monoarthritis	Tölle TR et al (82) J Neurol 242(S2):135
(f) Transkriptionsf.				
cFOS	↑	Rückenmark	Noxische Stimulierung	Hunt SP et al. (1987) Nature 328: 632-34
cJun, JunB, cFOS	↑	RM-Dorsalhorn	Formalin	Herdegen T et al. (1994) Mol Brain Res 22: 245-48
Krox24				

RM, Rückenmark; DRG, Dorsal Root Ganglia; CFA, Complete Freund Adjuvans; NGF, Nerve Growth Factor.

Daraus folgend war primäre Aufgabe der Erfindung, ein Screeningverfahren zur Identifizierung im Schmerz relevanter, insbesondere schmerzregulierender Substanzen zu entwickeln. Die
5 Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen mit folgenden Verfahrensschritten:

(a) Inkubation einer zu testenden Substanz unter geeigneten Bedingungen mit einer Zelle und/oder einer Präparation
10 aus einer solchen Zelle, die das Protein PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Protein, für das ein
15 Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der
20 Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden, oder ein mindestens 10 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine synthetisiert hat,

(b) Messung der Bindung der Testsubstanz an dem von der
25 Zelle synthetisierten Protein oder Teilprotein oder Messung mindestens eines der durch die Bindung der Testsubstanz an das Protein oder Teilprotein veränderten funktionellen Parameter.

30 Dieses neuartige Screeningverfahren basiert darauf, daß hier eine potentielle Schmerz-Wirksamkeit einer Substanz über ihre Wechselwirkung mit einer schmerzregulierten Proteinstruktur, insbesondere PIM1-Kinase

oder verwandte Strukturen, oder über eine Proteinstruktur mit einer schmerzrelevanten Verteilung im ZNS, insbesondere PIM3-Kinase oder verwandte Strukturen, aufgefunden werden kann.

- 5 Dabei bezieht sich der Begriff schmerzregulierend auf einen potentiellen regulierenden Einfluß auf das physiologische Schmerzgeschehen, insbesondere auf eine analgetische Wirkung. Der Begriff Substanz umfaßt jede als Arzneimittel-Wirkstoff geeignete Verbindung, insbesondere also niedermolekulare Wirkstoffe, aber auch andere wie Nukleinsäuren, Fette,
10 Zucker, Peptide oder Proteine wie Antikörper.

- Die Inkubation unter geeigneten Bedingungen ist hier so zu verstehen, daß die zu untersuchende Substanz mit der Zelle oder der entsprechenden Präparation in einem wässrigen Medium eine definierte Zeit vor der
15 Messung reagieren kann. Dabei kann das wässrige Medium temperiert werden, beispielsweise zwischen 4°C und 40°C, vorzugsweise bei Raumtemperatur oder bei 37°C. Die Inkubationszeit kann zwischen wenigen Sekunden und mehreren Stunden variiert werden, je nach der Wechselwirkung der Substanz mit dem Teilprotein oder Protein. Bevorzugt
20 sind aber Zeiten zwischen 1 min und 60 min. Das wässrige Medium kann geeignete Salze und/oder Puffersysteme enthalten, so daß bei der Inkubation beispielsweise ein pH zwischen 6 und 8, vorzugsweise pH 7,0 - 7,5 im Medium herrscht. Dem Medium können weiter geeignete Substanzen, wie Coenzyme, Nährstoffe etc. beigefügt werden. Die
25 geeigneten Bedingungen können vom Fachmann in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Wechselwirkung der Substanz mit dem Teilprotein oder Protein aufgrund seiner Erfahrung, der Literatur oder weniger, einfacher Vorversuche leicht festgelegt werden, um im Verfahren einen möglichst deutlichen Meßwert zu erhalten.

30

Eine Zelle, die ein bestimmtes Teilprotein oder Protein synthetisiert hat, ist eine Zelle, die dieses Teilprotein oder Protein bereits endogen exprimiert

hat oder eine solche, die gentechnisch verändert wurden, so daß sie dieses Teilprotein oder Protein exprimiert und entsprechend vor Beginn des erfindungsgemäßen Verfahrens das Teilprotein oder Protein enthält. Die Zellen können Zellen aus evt. immortalisierten Zelllinien sein oder
5 native aus Geweben stammende und aus diesen isolierte Zellen sein, wobei der Zellverband meist aufgelöst ist. Die Präparation aus diesen Zellen umfaßt insbesondere Homogenate aus den Zellen, das Cytosol, eine Membranfraktion der Zellen mit Membranfragmenten, eine Suspension isolierter Zellorganellen etc.

10

Die hier aufgezählten Proteine und Teilproteine wurden im Rahmen dieser Erfindung als durch Schmerz reguliert oder schmerzrelevant verteilt identifiziert, in dem in einem Tier Schmerz ausgelöst wurde und nach angemessener Zeit durch Schnitte im Rückenmark das Expressionsmuster
15 des Tieres mit denen eines Kontroll-Tieres ohne schmerzauslösende Maßnahmen verglichen. Die dabei gefundenen verändert exprimierten sind die PIM-1-Kinase sowie insbesondere bezüglich der schmerzrelevanten Verteilung die PIM-3-Kinase.

20 Aus welcher Spezies diese Proteine stammen, ist für die Funktion des Verfahrens unerheblich, es ist aber bevorzugt, die humane, Maus- oder Ratten-Variante zu verwenden. Die PIM1-Kinase ist in Hinblick auf die kodierende DNA- und die Aminosäure-Sequenz bekannt und auch in Ihrer generellen Funktion beschrieben. Das trifft zum Teil auch auf die PIM3-
25 Kinase zu, wobei bei dieser die bisher noch nicht bekannte kodierende DNA- und die Aminosäure-Sequenz in Maus und Mensch im Rahmen dieser Erfindung aufgeklärt wurde. Keine dieser Kinasen wurde aber bisher im Stand der Technik in einen Zusammenhang mit Schmerz und insbesondere der Schmerzregulation gebracht. Da hier die Identifizierung
30 der Proteine über eine Veränderung der Expression oder die Expressionsverteilung in einem In-vivo-Schmerzmodell erfolgte, hat das daraus abgeleitete erfindungsgemäße Screening-Verfahren für zukünftige

Arzneimittel unter Verwendung dieser Proteine den erheblichen Vorteil, nicht nur auf theoretischen Überlegungen aufzubauen, sondern vermutlich eine starke In-vivo-Relevanz zu besitzen. Da mit diesem Verfahren die Wechselwirkung von Substanzen mit im Schmerzbereich bisher nicht verwendeten Proteinen und Peptiden als Maßstab für das Auffinden schmerzregulierender Substanzen ermöglicht wird, sind mit diesem Verfahren jetzt möglicherweise schmerzrelevante Substanzen aufzufinden, die bei den im Stand der Technik bisher bekannten Verfahren mit anderen Peptiden oder Proteinen nicht aufgefallen wären. Auch dies ist ein erheblicher Vorteil des neuen erfindungsgemäßen Verfahrens.

Der Maßstab über den das Verfahren die Auffindung interessanter Substanzen erlaubt, ist entweder die Bindung an das Protein oder Teilprotein, die z.B. durch Verdrängung eines bekannten Liganden oder das Ausmaß gebundener Substanz nachgewiesen werden kann, oder die Veränderung eines funktionellen Parameters durch die Wechselwirkung der Substanz mit dem Teilprotein oder Protein. Diese Wechselwirkung kann insbesondere in einer Regulation, Hemmung und/oder Aktivierung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen liegen und veränderte funktionelle Parameter können beispielsweise die Genexpression, das Ionenmilieu, der pH oder das Membranpotentials, bzw. die Veränderung der Enzymaktivität oder der Konzentration der 2nd messenger sein.

Zur Erläuterung der Erfindung werden im folgenden neben den im allgemeinen Text zu Begriffen gegebenen Erklärungen weitere Definitionen angegeben, um klarzustellen, wie bestimmte, insbesondere in den Ansprüchen verwendete Begriffe im Sinne dieser Erfindung zu verstehen und auszulegen sind.

- Substanz: Damit ist eine chemische Verbindung gemeint. Hier handelt es sich im engeren Sinne um Verbindungen, die potentiell eine Wirkung im Körper entfalten können, niedermolekulare Wirkstoffe,

Nukleinsäuren, Fette, Zucker, Peptide oder Proteine, insbesondere hier niedermolekulare Wirkstoffe.

- 5 - schmerzregulierend: Im Sinne der Erfindung heißt schmerzregulierend, daß die Substanz die Wahrnehmung von Schmerz direkt oder indirekt beeinflusst, insbesondere natürlich analgetisch wirkt.
- 10 - Inkubation: Unter Inkubation ist das Einbringen und Belassen eines biologischen Untersuchungsobjektes, beispielsweise einer Zelle oder eines Proteins, in einem temperierten Medium wie in einem Brutschrank oder auf einem Wasserbad zu verstehen. Dabei heißt hier unter geeigneten Bedingungen eine Inkubation unter physiologischen Bedingungen (z.B. 37°C pH7,2) oder bei den Bedingungen, bei denen eine optimale Messung im Verfahren möglich wird.
- 15 - Zelle: Die Zelle ist ein sich selbst regulierendes, offenes, mit seiner Umgebung durch permanenten Stoffaustausch in einem Fließgleichgewicht stehendes System mit eigenem Stoffwechsel, und Vermehrungsfähigkeit. Die Zelle kann separat kultiviert oder Teil eines Gewebes, insbesondere aus einem Organ, sein, und dort vereinzelt oder noch im Zellverband vorliegen.
- 20 - Präparation aus einer Zelle: Darunter versteht man Präparate, die mittels chemischer, biologischer, mechanischer oder physikalischer Methoden unter Änderung der Zellstruktur hergestellt werden, beispielsweise Membranfragmente, isolierte Zellkompartimente, isoliertes Cytosol, oder aus Gewebe gewonnenes Homogenat.
- 25 - Peptid: Verbindung aus über peptidische Bindungen zu Ketten verknüpften Aminosäuren. Ein Oligopeptid besteht aus zwischen 2 und 9 Aminosäuren, ein Polypeptid aus zwischen 10 und 100 Aminosäuren.
- 30

- Protein: Verbindung aus über peptidische Bindungen zu Ketten verknüpften mehr als 100 Aminosäuren u.U. mit einer definierten Raumstruktur.
- 5 - Teilprotein: Verbindung aus über peptidische Bindungen zu Ketten verknüpften mehr als 10 Aminosäuren u.U. mit einer definierten Raumstruktur aber ausgeschnitten bzw. ausgewählt aus einem definierten Protein. Ein Teilprotein kann ein Peptid sein.
- 10 - PIM1-Kinase; PIM3-Kinase: Ein Proto-Oncogen und eine Serin-Threonin-Kinase.
- 15 - Polynukleotid: Das zugrundeliegende Nukleotid ist ein grundsätzlich aus Nucleinbase, Pentose und Phosphorsäure bestehender Grundbaustein der Nucleinsäuren. Diese entspricht einem hochmolekularen Polynucleotid aus mehreren Nukleotiden, die über Phosphorsäure-Pentose-Veresterung miteinander verknüpft sind. Unter dieser Erfindung fallen aber auch modifizierte Polynukleotide, die zwar die Basenabfolge beibehalten, aber über ein modifiziertes Rückgrat statt der
20 Phosphorsäure-Pentose verfügen.
- 25 - zu mindestens 90 (95, 97)% ähnlich: Darunter ist zu verstehen, daß die mit erfaßten Polynucleotide in ihrem kodierenden Bereich bezüglich der Basenabfolge zu mindestens 90% (95%, 97%) identisch mit der Referenz (Abbildung etc.) sind und die mit erfaßten Peptide und Proteine in ihrer Primärstruktur, der Abfolge der Aminosäuren zu mindestens 90% (95%, 97%) mit der Referenz identisch sind.
- 30 - Gen: Mit dem Begriff Gen wird ein Genomabschnitt mit einer definierten Nukleotidsequenz bezeichnet, der die Information zur Synthese einer m- oder prä-mRNA oder einer sonstigen RNA (z.B. tRNA, rRNA, snRNA

etc.) enthält. Es besteht aus kodierenden und nicht kodierenden Abschnitten.

- 5 - Genfragment: Nukleinsäureabschnitt, der in seiner Basenabfolge einen Teilbereich eines Gens beinhaltet
- 10 - Bindung an das Peptid, Teilprotein oder Protein: Wechselwirkung zwischen Substanz und Peptid, Teilprotein oder Protein, die zu Fixierung führt.
- 15 - funktionelle Parameter: darunter versteht man Meßgrößen eines Experimentes, die mit der Funktion eines Proteins (Ionenkanal, Rezeptor, Enzym) korrelieren
- 20 - gentechnisch manipuliert: Manipulation von Zellen, Geweben oder Organismen derart, daß hier genetisches Material eingebracht wird
- 25 - endogen exprimiert: Expression eines Proteins, die eine Zelllinie unter geeigneten Kulturbedingungen aufweist, ohne das dieses entsprechende Protein durch gentechnische Manipulation zur Expression veranlasst wurde
- 30 - G-Protein: International übliche Abkürzung für ein Gunaosintriphosphat (GTP)-bindendes Protein, das als Signalprotein durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert wird
- Reportergen: Generelle Bezeichnung für Gene, deren Genprodukte sich mit Hilfe einfacher biochemischer Methoden oder histochemischer Methoden einfach nachweisen lassen, wie z.B. Luziferase, alkalische Phosphatase oder Green Fluorescent Protein (GFP).

- (rekombinantes) DNA-Konstrukt: Generelle Bezeichnung für jede Art von DNA-Molekülen, die durch die in vitro-Verknüpfung von DNA-Molekülen entstanden sind.
- 5 - Klonierungsvektor: Generelle Bezeichnung für Nukleinsäure-Moleküle, die beim Klonieren als Träger von Fremdgenen oder Teilen dieser Gene dienen.
- 10 - Expressionsvektor: Bezeichnung für speziell konstruierte Klonierungsvektoren, die nach Einbringen in eine geeignete Wirtszelle die Transcription und Translation des in den Vektor einklonierten Fremdgens erlauben.
- 15 - LTR-Sequenz: Abkürzung für Long terminal repeat. Generelle Bezeichnung für längere Sequenzbereiche, die an beiden Enden eines linearen Genoms zu finden sind. Derartige Sequenzbereiche kommen z.B. in den Genomen von Retroviren und an den Enden eukaryontischer Transposons vor.
- 20 - Poly-A-Schwanz: die am 3'-Ende von messenger-RNAs durch Polyadenylierung angeheftenen Adenyl-Reste (ca. 20-250).
- 25 - Promotor-Sequenz: Bezeichnung für einen DNA-Sequenzbereich, von dem aus die Transkription eines Gens, d.h. die Synthese der mRNA, gesteuert wird.
- 30 - ORI-Sequenz: Abkürzung für Origin of replication. Die ORI-Sequenz erlaubt einem DNA-Molekül, sich als autonome Einheit in der Zelle zu vermehren.

- Enhancer-Sequenz: Bezeichnung für relativ kurze, zum Teil als Repetitionen auftretende, genetische Elemente, die in der Regel die Expression mancher Gene in unterschiedlichem Maße verstärken.
- 5 - Transkriptionsfaktor: Bezeichnung für ein Protein, das über eine Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, die Transkription eines Gens beeinflusst.
- 10 - kultivieren: Zellen oder Gewebe unter geeigneten Kulturbedingungen halten
- 15 - Bedingungen, die eine Expression erlauben, darunter versteht man die Auswahl und Anwendung von Kulturbedingungen die eine Expression des interessierenden Proteins erlauben, darunter gehören Temperaturänderung, Mediumwechsel, Zusatz von induzierenden Substanzen, Weglassen hemmender Substanzen.
- 20 - Inkubationszeit: Zeitdauer für die Zellen oder Gewebe inkubiert, d.h. einer definierten Temperatur ausgesetzt werden.
- 25 - Selektionsdruck: Anwendungen von Kulturbedingungen die Zellen mit einem bestimmtem Genprodukt, dem sog. Selektionsmarker, einen Wachstumsvorteil verschaffen.
- 30 - Amphibienzelle, Zelle aus einem Tier der Klasse der Amphibia
- Bakterienzelle, Zelle die dem Überreich der Eubacteria oder Archaeobacteria zuzuordnen ist, oder von ihr abstammt.
- Hefezelle, Zelle die der Ordnung der Endomycetalse zuzuordnen ist, oder von ihr abstammt.

- Insektenzelle, Zelle die der Ordnung der Hexapoda zuzuordnen ist, oder von ihr abstammt.
- 5 - native Säugetierzelle, aus einem Säugetier stammende Zelle, die in ihren relevanten Merkmalen der im Organismus befindlichen Zelle entspricht.
- 10 - immortalisierte Säugetierzelle: Zelle die durch die angewendeten Kulturbedingungen oder gentechnische Manipulation die Eigenschaft erlangt hat, sich über die normalerweise übliche Teilungshäufigkeit hinaus (ca.100) in der Kultur zu teilen.
- 15 - markiert: durch entsprechende Modifizierung oder Derivatisierung für eine Nachweisreaktion zugänglich gemacht. Beispielsweise radioaktiv, fluoreszierend oder lumineszierend.
- 20 - Ligand: Substanz, die an ein im Körper oder einer Zelle befindliches Molekül, im speziellen einen Rezeptor, bindet
- Verdrängung: vollständiges oder partielles Entfernen eines Liganden von seiner Bindungsstelle
- 25 - gebundene Aktivität: Biochemisch oder physikalisch erfaßter Meßwert, der mit der an einem Rezeptor gebundenen Ligandenmenge korreliert
- Regulation: die als Teil eines Regelprozesse erfolgte Hemmung oder Aktivierung eines Vorgangs
- 30 - Hemmung: als Sonderfall der Regulation die Verhinderung/Minderung eines Vorgangs

- Aktivierung: als Sonderfall der Regulation die Verstärkung eines Vorgangs
- 5 - Rezeptoren: Im weitesten Sinne alle im pro- oder eukaryoten Organismus vorhandenen Moleküle, an die ein Wirkstoff binden kann. Im engeren Sinne membrangebundene Proteine oder Komplexen mehrerer Proteine, die durch Bindung eines Wirkstoffes eine Änderung in der Zelle hervorrufen.
- 10 - Ionenkanäle: Membrangebundene Proteine oder Komplexe mehrerer Proteine, durch die Kationen oder Anionen durch die Membran hindurchgelangen können.
- 15 - Enzyme: Bezeichnung für Proteine oder Komplexe aus einer aktivierenden Nichteiweißkomponente mit einem Protein, die katalytische Eigenschaften besitzen.
- 20 - Genexpression (exprimieren/exprimierbar): das Übersetzen der genetischen Information eines Genes in RNA (RNA-Expression) oder in Protein (Proteinexpression).
- Ionenmilieu: Ionenkonzentration eines oder mehrerer Ionen in einem bestimmten Kompartiment.
- 25 - Membranpotential: Spannungsdifferenz über eine Membran aufgrund eines Überschusses an Kationen auf der einen Seite und Anionen auf der anderen Seite der Membran.
- Veränderung der Enzymaktivität: Hemmung oder Induktion der
30 katalytischen Aktivität eines Enzyms.

- 2nd messenger: kleines Molekül, das als Antwort auf ein extrazelluläres Signal entweder im Cytosol gebildet wird oder in das Cytosol hineinwandert und dabei hilft die Information an das Zellinnere weiterzugeben, wie zum Beispiel cAMP, IP₃.

5

- (Gen-)Sonde: Bezeichnung für jede Art von Nukleinsäuren, mit deren Hilfe man ein gesuchtes Gen oder eine bestimmte DNA-Sequenz nachweisen kann. Durch Derivatisierung der Gensonde (z.B. Biotin, magnetische Beads, Digoxinin) können zudem DNA-Moleküle aus einem Gemisch herausgezogen werden. Als Sonden werden klonierte Gene, Genfragmente, chemisch synthetisierte Oligonukleotide und auch RNA verwendet, die meist radioaktiv markiert ist.

10

- DNA: Internationale Bezeichnung für Desoxyribonukleinsäure

15

- genomische DNA: Generelle Bezeichnung für die bei eukaryontischen Organismen aus dem Zellkern einer Zelle stammenden DNA.

- cDNA: Abkürzung für complementary DNA. Bezeichnung für die einzel- bzw. doppelsträngige DNA-Kopie eines RNA-Moleküls.

20

- cDNA-Bank/Bibliothek: Bezeichnung für eine Sammlung von willkürlich klonierten cDNA-Fragmenten, die zusammengekommen die Gesamtheit aller von einer Zelle oder einem Gewebe synthetisierten RNA repräsentieren.

25

- cDNA-Klon: Bezeichnung für eine Population genetisch einheitlicher Zellen, die sich von einer einzigen Zelle ableiten, derart, daß diese Zelle eine künstlich eingebrachtes cDNA-Fragment enthält.

30

- Hybridisierung: Durch Basenpaarung bewirkte Ausbildung eines doppelsträngigen Nukleinsäuremoleküls aus zwei getrennten Einzelsträngen.
- 5 - stringente Bedingungen: Bedingungen, unter denen nur perfekt basengepaarte Nukleinsäure-Stränge gebildet werden und stabil bleiben.
- isolieren: ein gesuchtes Molekül aus einem Gemisch herausfinden und
10 abtrennen.
- DNA-Sequenzierung: Bestimmung der Abfolge der von Basen in einem DNA-Molekül.
- 15 - Nukleinsäuresequenz: Bezeichnung für die Primärstruktur eines DNA-Moleküls, d.h. die Abfolge der einzelnen Basen, aus denen sich eine DNA zusammensetzt.
- Gen-spezifische Oligonukleotid Primer: Oligonukleinsäuren, also 10-40
20 Basen lange Nukleinsäurefragmente, die in ihrer Basenzusammensetzung eine stringente Hybridisierung an das gesuchte Gen oder die gesuchte cDNA erlauben.
- Ermitteln von Oligonukleotid Primern: Die manuelle oder
25 Computerunterstützte Suche von Oligonukleotiden zu einer vorgegebenen DNA-Sequenz, die für eine Hybridisierung und/oder eine Polymerase-Ketten Reaktion optimal geeignet sind.
- PCR: Abkürzung für Polymerase-Kettenreaktion. In vitro-Verfahren zur
30 selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen.

- DNA-Template: Nukleinsäuremolekül oder ein Gemisch von Nukleinsäuremolekülen, aus denen ein DNA-Abschnitt mit Hilfe der PCR (s.o.) vervielfältigt wird.
5
- RNA: International gebräuchliche Abkürzung für Ribonukleinsäuren
- mRNA: International gebräuchliche Abkürzung für messenger-Ribonukleinsäuren, die am Transfer der genetischen Information aus dem Kern in die Zelle beteiligt sind und die Information für die Synthese eines Polypeptids oder eines Proteins beinhalten.
10
- Antisense Polynukleotid: Eine aus mehreren natürlichen oder modifizierten Nukleinsäuren bestehendes Molekül, deren Basenabfolge komplementär zur Basenabfolge eines Teilbereiches einer in der Natur vorkommenden RNA ist.
15
- PNA: International gebräuchliche Abkürzung für peptidic Nucleic Acids. Hierbei bilden peptidisch verknüpfte Aminosäuren eine Kette, wobei die Aminosäuren als Seitenkette eine für die Hybridisierung mit DNA oder RNA fähigen Base trägt.
20
- Sequenz: Abfolge von Nukleotiden oder Aminosäuren. Im spezifischen Sinne dieser Erfindung ist damit die Nukleinsäuresequenz gemeint.
25
- Ribozym: Bezeichnung für eine katalytisch aktive Ribonukleinsäure (z.B. Ligase, Endonuklease, Polymerase, Exonuklease)
- DNA-Enzym: Bezeichnung für ein DNA-Molekül, das katalytische Aktivität beinhaltet (z.B. Ligase, Endonuklease, Polymerase, Exonuklease)
30

- katalytische RNA/DNA: generelle Bezeichnung für Ribozyme bzw. DNA-Enzyme (s.o.).
- Adenovirus: bei Vertebraten vorkommender cytopathogener Virus
- 5 - Adenoassoziiertes Virus (AAV): Gehört zur Familie der Parvoviren. Für eine effektive Vermehrung des AAV ist eine Coinfektion der Wirtszellen mit Helferviren (z.B. Herpes-, Vaccina- oder Adenoviren) erforderlich. Die Eigenschaft von AAV, stabil in das Wirtsgenom zu integrieren, 10 macht es als Transduktionsvektor für Säugetierzellen besonders interessant.
- Herpesvirus: Viraler Erreger der Herpes-Infektion
- 15 - posttranslationale Modifikation: Veränderung an Proteinen oder Polypeptiden, die nach der Translation durchgeführt wird, hierzu zählen z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung, Amidierung, Acetylierung oder Proteolyse.
- 20 - glykosilieren: Bezeichnung für das Anhängen von einzelnen Zuckermolekülen oder ganzen Zuckerketten an Proteine.
- phosphorylieren: Bezeichnung für das Anhängen von einem oder mehreren Phosphatresten an ein Protein, bevorzugt an die OH- 25 Gruppen der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin.
- amidieren: Die Bezeichnung für das Umwandeln einer Carboxylfunktion in eine Amidfunktion, z.B. an den carboxyterminalen Aminosäurerest eines Peptides oder Proteins.

- mit Membrananker versehen: Posttranslationelle Modifikation eines Proteins, oder eines anderen organischen Moleküls, derart daß es durch Anhängen eines hydrophoben Moleküls, geeigneterweise eine Fettsäure oder ein Derivat derselben, an die Lipiddoppelschicht-Membran von Zellen verankert wird.
5
- spalten: in diesem spezifischen Fall die Spaltung eines Peptids oder Proteins in mehrere Untersequenzen.
- 10 - verkürzen: Ein aus mehreren Einzelteilen bestehendes Molekül um eine oder mehrere Teile zu verkürzen.
- Antikörper: Lösliche, oder an Zellmembranen gebundene, als Immunglobuline bezeichnete Proteine mit einer spezifischen Bindungsstelle für Antigene.
15
- monoklonaler Antikörper: sind gegen eine einzige antigene Determinante eines Antigens gerichtete Antikörper mit extrem hoher Selektivität
20
- polyklonaler Antikörper: Gemisch aus Antikörpern, die gegen mehrere Determinanten eines Antigens gerichtet sind.
- transgen: genetisch verändert
25
- nichthumanes Säugetier: Die Gesamtheit der Säugetiere (Klasse der Mammalia) mit Ausnahme der Spezies Mensch.
- Keim-Zelle: Zelle mit haploidem Genom, die durch Verschmelzung mit einer zweiten Keimzelle die Bildung eines neuen Organismus ermöglicht.
30

- somatische Zelle: diploide Zelle als Bestandteil eines Organismus
- chromosomale Einbringung: Eingriff in die Nukleotidsequenz auf chromosomaler Ebene
- 5 - Genom: Allgemeine Beschreibung für die Gesamtheit aller Gene in einem Organismus
- 10 - Vorfahr des Tieres: Ein Tier (der Vorfahr), das auf natürliche oder künstliche Weise durch Weitergabe an seinem genetischen Material in direkter Linie mit einem anderen Tier (dem Nachfahren) verwandt ist.
- 15 - exprimierbar: Ein Nukleinsäuremolekül ist dann exprimierbar, wenn es die Information zur Synthese eines Proteins oder Polypeptids beinhaltet und mit entsprechenden regulatorischen Sequenzen versehen ist, die eine Synthese dieses Proteins oder Polypeptids in vitro oder in vivo erlauben. Wenn diese Voraussetzungen nicht mehr gegeben sind, beispielsweise durch Eingriff in die kodierende Sequenz, ist das Nukleinsäuremolekül nicht mehr exprimierbar.
- 20 - Nagetier: Tier aus der Ordnung der Rodentia, z.B. Ratte oder Maus
- 25 - als schmerzregulierende Substanz identifizierbar: Substanz, die bei Einbringung in einen lebenden Organismus eine Verhaltensänderung bewirkt, die der Fachmann als schmerzhemmend bezeichnet (antinozizeptiv, antihyperalgetisch oder antiallodynisches). Im Falle des Screeningverfahrens bezieht sich dies darauf, daß die Substanz beim Screening durch stärkere Bindung oder Auslösung einer Änderung eines funktionellen Parameters deutlich, beispielsweise 100 %, die
- 30 Bindung oder Wechselwirkung des Durchschnitts der getesteten Substanzen übertrifft.

- Verbindung: ein anderer Name für Molekül, als aus mehreren Atomen bestehend, hier ein durch das erfindungsgemäße Verfahren identifiziertes Molekül.
- 5 - Wirkstoff: Eine Verbindung, die bei Anwendung an einem Organismus eine Veränderung in diesem Organismus hervorruft. Im Besonderen werden darunter organisch-chemisch synthetisierte Moleküle verstanden, die auf den Organismus eine heilende Wirkung ausüben. Hier insbesondere Moleküle, die an die erfindungsgemäßen Proteine
10 und Peptide binden.
- niedermolekular: Molekül mit einem Molekulargewicht < 2kDa
- Arzneimittel: ein Stoff entsprechend der Definition im Artikel 1 §2 des
15 Gesetzes über den Verkehr mit Arzneimitteln
- Diagnostikum: Verbindung oder Verfahren, das verwendet werden kann, um eine Krankheit zu diagnostizieren
- 20 - Behandlung von Schmerz: Verfahren, mit dem Ziel Schmerzen zu lindern oder aufzuheben, oder das zu erwartende Auftreten von Schmerzen zu hemmen (preemptive Analgesie).
- chronischer Schmerz: eine Schmerzempfindung von länger anhaltender
25 Dauer, oft dadurch gekennzeichnet, daß sie über Zeitpunkt und Ort des initialen Stimulus hinausreicht, die Schmerzempfindlichkeit des Körpers steigert.
- Gentherapie: Unter Gentherapie versteht man alle Verfahren, die das
30 Ziel haben, genetische Erkrankungen durch geeignete Veränderungen des Genoms kausal zu behandeln.

- In-vivo-Gentherapie: Einbringen von genetischem Material in den lebenden Organismus mit dem Ziel der Gentherapie. Man kann zwischen somatischem und Keimbahn-Eingriff unterscheiden, der einmal an diploiden Zellen und einmal an haploiden Zellen stattfindet.
- 5
- In-vitro-Gentherapie: Einbringen von genetischem Material in Zellen außerhalb des menschlichen Körpers mit dem Ziel diese nachher wieder durch Einbringen in den menschlichen Körper zur Gentherapie zu verwenden.
- 10
- Diagnostik: Verfahren, um eine Krankheit zu identifizieren.
- Wirksamkeitsuntersuchung: Untersuchung mit dem Ziel die Wirksamkeit einer Verbindung nach Einwirkung auf einen lebenden Organismus zu untersuchen.
- 15

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird die Zelle vor dem Schritt (a) gentechnisch manipuliert. Dabei wird genetisches Material in die Zelle eingebracht, insbesondere eine oder mehrere Polynukleotidsequenzen. In einer weiter bevorzugten Variante dieser Ausführungsform erlaubt die gentechnische Manipulation die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter. In dieser Ausführungsform werden durch gentechnische Manipulation Voraussetzungen geschaffen unter denen die Veränderung eines funktionellen Parameters überhaupt oder verbessert gemessen werden kann. Dabei ist es insbesondere bevorzugt, daß durch die gentechnische Manipulation eine in der Zelle nicht endogen exprimierte Form eines G-Proteins exprimiert oder ein Reportergen eingeführt wird. Darunter ist insbesondere die gentechnische Einführung eines endogen nicht vorhandenen oder physiologisch nicht exprimierten G-Proteins (GTP-bindenden Proteins) in die Zelle zu verstehen, beispielsweise die Einführung eines chimären G-Proteins, das eine Veränderung des

20

25

30

Signalweges erlaubt oder eines promiskuitiven G-Proteins, das sehr bindungsfreudig ist. Die Einführung eines Reportergens wiederum erlaubt die Messung einer (extrazellulär ausgelösten) induzierten Expression des Genproduktes.

5

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Zelle gentechnisch so manipuliert, daß die Zelle mindestens ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid enthält. Damit kann beispielsweise erreicht
10 werden, daß ein Teilprotein oder Protein, das in der im Verfahren verwendeten Zelle oder Präparation nicht endogen exprimiert wird, von der Zelle synthetisiert wird. Dabei ist es insbesondere bevorzugt, wenn das Polynukleotid in einem rekombinanten DNA-Konstrukt enthalten ist. Unter einem (rekombinanten) DNA-Konstrukt versteht man ein in-vitro
15 hergestelltes DNA-Molekül.

Wenn beim Verfahren vor dem Schritt a) die Zelle gentechnisch manipuliert wird, ist es bevorzugt, daß die Zelle nach der gentechnischen Manipulation und vor dem Schritt (a) unter Bedingungen, die eine Expression erlauben,
20 kultiviert wird, gegebenenfalls unter Selektionsdruck. Unter kultivieren versteht man, Zellen oder Gewebe bei Bedingungen, die ein Überleben der Zellen, bzw. deren Nachfolgegeneration sichern, zu halten. Dabei sollten die Bedingungen hier so gewählt werden, daß eine Expression des durch die gentechnische Manipulation eingefügten Materials ermöglicht wird.
25 Dazu sollten pH, Sauerstoffgehalt, und Temperatur physiologisch gehalten sein und ausreichend Nährstoffe und notendige Cofaktoren beigelegt sein. Der Selektionsdruck erlaubt, nur die Zellen weiter zu kultivieren, bei denen die gentechnische Manipulation zumindest teilweise erfolgreich war. Dazu gehört beispielsweise die Einführung einer Antibiotikaresistenz über das
30 DNA-Konstrukt.

Es ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren besonders bevorzugt, wenn die verwendete Zelle eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle ist. Beispiele für Amphibienzellen sind Xenopus Oocyten, für Bakterienzellen
5 E-coli-Zellen, für Hefezellen solche auch Saccharomyces cerevisiae, für Insektenzellen Sf9-Zellen, für immortalisierte Säugetierzelle HeLa-Zellen und für native Säugetierzellen die CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zelle.

Bei einer bevorzugten Meßmethode zur Feststellung der Bindung der
10 Substanz an Teilprotein oder Protein im erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Messung der Bindung über die Verdrängung eines bekannten markierten Liganden vom Teilprotein oder Protein und/oder über die daran gebundene Aktivität einer markierten Testsubstanz. Dabei ist ein Ligand ein mit hoher Spezifität an das Protein oder Teilprotein bindendes Molekül,
15 das durch eine ebenfalls bindende, zu testende Substanz aus der Bindungsstelle verdrängt wird. Unter Markierung ist eine den Nachweis erleichternde künstliche Modifikation am Molekül zu verstehen. Beispiele sind radioaktive, fluoreszierende oder lumineszierende Markierung.

Bei einer anderen bevorzugten Meßmethode zur Feststellung der durch die Bindung der Substanz an Teilprotein oder Protein im erfindungsgemäßen Verfahren ausgelösten Veränderung der funktionellen Parameter, erfolgt die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter über Messung der Regulation, Hemmung und/oder
25 Aktivierung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen, insbesondere über Messung der Veränderung der Genexpression, des Ionenmilieus, des pH oder des Membranpotentials, über Veränderung der Enzymaktivität oder der Konzentration der 2nd messenger. Damit ist auf der einen Seite direkt die Messung der Wirkung der Substanz über die
30 Beeinflussung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen erfaßt, auf der anderen Seite als bevorzugt zu messende Beispiele sich ändernder Parameter wie Genexpression, Ionenmilieu, pH, Membranpotential,

Enzymaktivität oder Konzentration der 2nd messenger. Dabei versteht man unter Ionenmilieu insbesondere die Konzentration eines oder mehrerer Ionen in einem Zellkompartiment, insbesondere dem Cytosol, unter Membranpotential die Ladungsdifferenz zwischen zwei Seiten einer Biomembran und unter 2nd messenger Botenstoffe des intrazellulären Signalwegs wie z.B. zyklisches AMP (cAMP), Inositoltriphosphat (IP3) oder Diacylglycerol (DAG).

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird das Teilprotein oder Protein in den Schritten (a) und (b) ausgewählt aus:

- der PIM-1-Kinase,
- einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnliches Polynukleotid kodiert,
- einem Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d) oder 1f), oder einem dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnlichem Protein und/oder
- einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder deren Antiisense Polynukleotide bindet,
- oder einem mindestens 10 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine.

Darunter erfaßt ist die Verwendung von Teilproteinen und insbesondere Proteinen mit bekannter Sequenz und Funktion, ohne daß für diese im Stand der Technik eine Funktion im Schmerz bekannt war.

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist auch ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 2a) und 2e)

dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht. Hiervon sind die dargestellten Genfragmente selbst umfaßt, wie auch ein Polynukleotid, das entweder vollständig oder zumindest Teilen der kodierenden Sequenz des dem Fragment entsprechenden Gens entspricht. Damit sind auch Polynukleotide gemeint, die mindestens 90%-ige, vorzugsweise 95%-ige, insbesondere wenigstens 97%-ige Übereinstimmung in der Basenabfolge mit der kodierenden Sequenz der abgebildeten Polynukleotide oder der kodierenden Sequenz der Gens aufweisen.

10

Es ist weiter bevorzugt, daß es sich bei dem Polynukleotid um RNA bzw. ein- oder doppelstängige DNA, insbesondere mRNA oder cDNA handelt.

Ebenso ist es bevorzugt, daß es sich bei dem Polynukleotid um ein Antisense-Polynukleotid oder PNA handelt, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an ein erfindungsgemäßes Polynukleotid zu binden. Dabei versteht man unter PNA „peptidic nucleic acid“ (peptidische Nukleinsäure), die zwar die Basenpaare trägt, aber dessen Rückgrat peptidisch gebunden ist. Ein Antisense-Polynukleotid zeigt die komplementäre Basenabfolge zu mindestens einem Teil einer Basis-Nukleinsäure. Ebenfalls bevorzugt ist es, daß das Polynukleotid Teil eines Ribozym oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA bzw. DNA ist. Unter Ribozym ist eine katalytisch aktive Ribonukleinsäure zu verstehen, unter DNA-Enzym eine entsprechende Desoxyribonukleinsäure, also katalytische RNA beziehungsweise DNA.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor enthaltend eines dieser vorangehend beschriebenen erfindungsgemäßen Polynukleotide. Unter einem Vektor versteht man ein Nukleinsäuremolekül, das bei gentechnischer Manipulation dazu dient, Fremdgene zu enthalten bzw. zu übertragen. Besonders bevorzugt ist dabei, daß es sich um einen

30

Expressionsvektor handelt. Er dient damit der Expression des enthaltenen Fremdgens, des Polynukleotids.

Weiter bevorzugt ist ein derartiger Vektor, der abgeleitet ist von einem
5 Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder
Herpesvirus und/oder er mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor-
und/oder ORI-Sequenz enthält. Ein LTR ist ein „Long-TerminalRepeat“, ein
am Ende befindlicher Abschnitt beispielsweise bei Viren. Poly-A-Sequenz
ist ein mehr als 20 Adenosinreste langer Schwanz. Eine Promotorsequenz
10 ist der Steuerungsbereich für die Transkription.

Ein weiterer Gegenstand ist ein Protein bzw. ein daraus abgeleitetes
Teilprotein, das durch eines der bereits als separate Gegenstände der
Erfindung beschriebenen Polynukleotide kodiert wird.

15 Ein weiter Gegenstand der Erfindung ist auch ein Protein bzw. ein daraus
abgeleitetes Teilprotein, für das ein Polynukleotid kodiert, daß unter
stringenten Bedingungen mit einem der Polynukleotide gemäß Abbildung
2a) oder 2e) oder deren Antisense-Polynukleotid hybridisiert.

20 Ein weiter Gegenstand der Erfindung ist auch ein Protein bzw. ein daraus
abgeleitetes Teilprotein, welches einer der in einer der Abbildungen 2b)
oder 2f) dargestellten Aminosäuresequenzen zu wenigstens 90%,
vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht.

25 Es ist auch Gegenstand dieser Erfindung, wenn das Protein bzw. ein
daraus abgeleitetes Teilprotein posttranslational modifiziert wurde, es
insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert,
ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen,
30 gespalten oder verkürzt wurde. Posttranslationale Modifikationen sind
beispielsweise dem Voet/Voet, Biochemistry, 1st Edition, 1990, S. 935-938
zu entnehmen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Antikörper gegen ein bereits als separater Gegenstand der Erfindung beschriebenes Protein bzw. Teilprotein. Dabei ist es bevorzugt, wenn es sich bei dem Antikörper um
5 einen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper handelt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Zelle, enthaltend ein bereits als separaten Gegenstand der Anmeldung beschriebenes Polynukleotid, ein bereits als separaten Gegenstand der Anmeldung beschriebenes
10 Protein oder Teilprotein und/oder einen bereits als separaten Gegenstand der Anmeldung beschriebenen Vektor. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn es sich um eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle handelt. Beispiele für Amphibienzellen sind *Xenopus* Oocyten, für Bakterienzellen
15 *E.-coli*-Zellen, für Hefezellen solche auch *Saccharomyces cerevisiae*, für Insektenzellen Sf9-Zellen, für immortalisierte Säugetierzelle HeLa-Zellen und für native Säugetierzellen die CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zelle.

Die besonders ausgewählte Form der Zelle enthält eine besonders
20 ausgewählte Form des Polynukleotids, eine besonders ausgewählte Form des Proteins oder Teilproteins und/oder eine besonders ausgewählte Form des Vektors.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein transgenes nichthumanes
25 Säugetier, dessen Keim- und somatische Zellen eine der bereits als separaten Gegenstand der Erfindung beschriebenen Polynukleotide als Resultat einer chromosomalen Einbringung in das Genom des Tieres oder das Genom eines der Vorfahren des genannten Tieres enthalten. Dabei versteht man unter chromosomaler Einbringung, dass der gentechnische
30 manipulative Eingriff sich im Chromosom des Tieres auswirkt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein transgenes nichthumanes Säugetier, dessen Keim- und somatische Zellen als Resultat einer chromosomalen Manipulation im Genom des Tieres oder im Genom eines der Vorfahren des genannten Tieres eine der separaten Gegenstand der Erfindung beschriebenen Polynukleotide, die keine Anti-Sense-Nukleotide sind, insbesondere gemäß Abbildung 2a) oder 2e), nicht mehr in exprimierbarer Form enthalten. Die chromosomale Manipulation betraf das Gen des Tieres oder seiner Vorfahren. Unter nicht mehr exprimierbar versteht man, wenn die Information zur Synthese eines Polypeptids oder Proteins, obwohl in nativer Form vorhanden, nicht mehr die vollständige Synthese erlauben. Beispiele sind Veränderung der regulatorischen Sequenzen oder Herausschneiden eines Teils des nativen Nukleinsäuremoleküls im kodierenden Bereich.

Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn das transgene nichthumane Säugetier ein Nagetier ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Verbindung identifizierbar als schmerzregulierende Substanz durch ein erfindungsgemäßes Verfahren. Hierbei bezieht sich Verbindung insbesondere auf niedermolekulare Wirkstoffe, aber auch auf Peptide, Proteine und Nukleinsäuren. Dabei bedeutet identifizierbar, daß die Verbindung das Merkmal aufweist, daß es beim erfindungsgemäßen Screeningverfahren bezüglich der Bindung deutlich stärker, vorzugsweise doppelt so stark bindet wie der Durchschnitt der zu testenden Substanzen oder bezüglich der Änderung der funktionellen Parameter deutlich vom Durchschnitt der zu testenden Substanzen abweicht.

Eine besonders ausgewählte Form der erfindungsgemäße Verbindung ist durch ein Verfahren unter Verwendung eines Proteins oder Teilproteins in den Schritten (a) und (b), das ausgewählt ist aus:

- der PIM-1-Kinase,

- einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnliches Polynukleotid kodiert,
- 5 - einem Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), oder einem dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnlichem Protein und/oder
- einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder deren Antisense Polynukleotide bindet,
- 10 - oder einem mindestens 10 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine,

15

als schmerzregulierende Substanz identifizierbar ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel enthaltend

- 20 a. ein Polynukleotid kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 25 b. ein Polynukleotid, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. einen Vektor enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- 30 d. eine PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f)

- und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder ein mindestens 10 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine,
- 5
- 10
- e. einen Antikörper gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. eine Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- 15
- g. eine Verbindung, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren als schmerzregulierende Substanz identifiziert wurde, und/oder
- 20
- h. einen Wirkstoff, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,
- sowie gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe. Die erfindungsgemäßen Arzneimittel können als flüssige Arzneiformen in Form von Injektionslösungen, Tropfen oder Säfte, als halbfeste Arzneiformen in Form von Granulaten, Tabletten, Pellets, Patches, Kapseln, Pflaster oder Aerosolen verabreicht werden und enthalten neben den mindestens einem erfindungsgemäßen Gegenstand je nach galenischer Form gegebenenfalls
- 25
- 30
- Trägermaterialien, Füllstoffe, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel, Farbstoffe und/oder Bindemittel. Die Auswahl der Hilfsstoffe sowie die einzusetzenden Mengen derselben hängt davon ab, ob das Arzneimittel oral, peroral,

parenteral, intravenös, intraperitoneal, intradermal, intramuskulär, intranasal, buccal, rectal oder örtlich, zum Beispiel auf Infektionen an der Haut, der Schleimhäute und an den Augen, appliziert werden soll. Für die orale Applikation eignen sich Zubereitungen in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Granulaten, Tropfen, Säften und Sirupen, für die parenterale, topische und inhalative Applikation Lösungen, Suspensionen, leicht rekonstituierbare Trockenzubereitungen sowie Sprays. Erfindungsgemäße Gegenstände in einem Depot in gelöster Form oder in einem Pflaster, gegebenenfalls unter Zusatz von die Hautpenetration fördernden Mitteln, sind geeignete perkutane Applikationszubereitungen. Oral oder perkutan anwendbare Zubereitungsformen können die erfindungsgemäßen Gegenstände verzögert freisetzen. Die an den Patienten zu verabreichende Wirkstoffmenge variiert in Abhängigkeit vom Gewicht des Patienten, von der Applikationsart, der Indikation und dem Schweregrad der Erkrankung. Üblicherweise werden 2 bis 500 mg/kg wenigstens eines erfindungsgemäßen Gegenstandes appliziert. Wenn das Arzneimittel insbesondere zur Gentherapie verwendet werden soll, empfehlen sich als geeignete Hilfs- oder Zusatzstoffe beispielsweise eine physiologische Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Proteinase-, DNase-Inhibitoren etc.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Diagnostikum enthaltend mindestens

- 25 a. ein Polynukleotid kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3-Kinase oder ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 30 b. ein Polynukleotid, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,

- c. einen Vektor enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- d. eine PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder ein zu
5 einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter
10 stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder ein mindestens 10 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine,
- e. einen Antikörper gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß
15 Punkt d),
- f. eine Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- g. eine Verbindung, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren als
20 schmerzregulierende Substanz identifiziert wurde, und/oder
- h. einen Wirkstoff, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

sowie gegebenenfalls geeignete Zusatzstoffe. Dabei versteht man unter
25 Diagnostikum ein Hilfsmittel zur Diagnose beispielsweise eines Krankheitsgeschehens.

Bevorzugt ist auch eine Form des Diagnostikums, das ein Polynukleotid enthält, bei dem es sich um ein Antisense Polynukleotid oder PNA handelt.

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung

- 5 a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- 10 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- d. einer PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die
- 15 unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder eines mindestens 10 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine,
- 20 e. eines Antikörpers gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper
- 25 gemäß Punkt e)
- 30

- g. einer Verbindung, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren als schmerzregulierende Substanz identifiziert wurde, und/oder
- h. eines Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Schmerz.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung zur Behandlung des chronischen, insbesondere neuropathischen oder entzündungsbedingten Schmerzes.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung

- a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b) oder einen Vektor gemäß Punkt c)

für die Gentherapie. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn es sich um In-vivo oder In-vitro Gentherapie handelt. Unter Gentherapie versteht man eine Therapieform, bei der durch die Einführung von Nukleinsäuren in Zellen ein Effektorgen, meist ein Protein, exprimiert wird. Man unterscheidet prinzipiell In-vivo- und In-vitro-Verfahren. In In-vitro-Verfahren

werden Zellen aus dem Organismus entfernt und ex-vivo mit Vektoren transfiziert, um anschließend wieder in denselben oder in einen anderen Organismus eingebracht zu werden. Bei der In-vivo-Gentherapie werden Vektoren, beispielsweise zur Bekämpfung von Tumoren, systemisch (z.B. über die Blutbahn) oder direkt in das Zielgewebe (z.B. in einen Tumor) appliziert.

Bevorzugt beim Einsatz in der Gentherapie ist auch die Verwendung eines Polynukleotids, beim dem es sich um ein Antisense Polynukleotid oder PNA handelt, oder das Teil eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung

- a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- d. einer PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder

- eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder eines mindestens 10 (vorzugsweise 20) Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine,
- 5
- e. eines Antikörpers gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
 - f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
 - 10
 - g. einer Verbindung, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren als schmerzregulierende Substanz identifiziert wurde, und/oder
 - 15
 - h. eines Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,
- für die Diagnostik und/oder für Wirksamkeitsuntersuchungen. Dabei versteht man unter Diagnostik die Analyse von einem Krankheitsbild zugeordneten Symptomen und unter Wirksamkeitsuntersuchungen Untersuchungen über die Wirksamkeit zu testender Substanzen, insbesondere ihrer medizinischen Wirksamkeit.
- 20
- 25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Peptids oder Proteins, bei dem eine erfindungsgemäße Zelle, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid und/oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält, kultiviert und gegebenenfalls das Peptid oder Protein isoliert wird.
- 30
- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung

- 5 a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- 10 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- d. einer PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder
- 15 eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder eines mindestens 10 (vorzugsweise 20) Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine,
- 20 e. eines Antikörpers gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper
- 25 gemäß Punkt e),
- 30

in einem Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen.

Dabei ist es für ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein
erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße
5 Verwendung besonders bevorzugt, wenn das Polynukleotid gemäß Punkt
a) ein Polynukleotid kodierend für PIM1-Kinase oder ein Polynukleotid,
welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) dargestellten
Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere
zu wenigstens 97% entspricht, ist

10

und/oder

das Protein gemäß Punkt d) eine PIM-1-Kinase und/oder ein Protein
gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d) oder 1f) und/oder ein zu einem
15 dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein
und/oder ein Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der
Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu mindestens 90 %
ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine
Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein
20 Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder
deren Antisense Polynukleotide binden oder ein mindestens 10
Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine ist.

Dabei ist es für ein erfindungsgemäßes Polynukleotid (auch Anti-Sense
etc.), ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes
25 Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders
bevorzugt, wenn das Polynukleotid (gegebenfalls gemäß Punkt a) und/oder
Punkt b)) eine RNA oder eine ein- oder doppelstängige DNA, insbesondere
mRNA oder cDNA ist.

30

Dabei ist es für ein erfindungsgemäßes Polynukleotid (nicht Anti-Sense
etc.), ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes

Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn das Polynukleotid (gegebenfalls gemäß Punkt b)) Teil eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA ist.

5

Dabei ist es für einen erfindungsgemäßen Vektor, ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn der Vektor (gegebenfalls gemäß Punkt c)) ein Expressionsvektor ist.

10

Dabei ist es weiter für einen erfindungsgemäßen Vektor, ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn der Vektor (gegebenfalls gemäß Punkt c)) abgeleitet ist von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder er mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz enthält.

15

Dabei ist es für ein erfindungsgemäßes Protein oder Teilprotein, ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung (nicht Gentherapie) besonders bevorzugt, wenn das Protein oder Teilprotein (gegebenfalls gemäß Punkt d)) posttranslational modifiziert wurde, es insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde.

20

25

Dabei ist es für einen erfindungsgemäßen Antikörper (auch Anti-Sense etc.), ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung (nicht Gentherapie) besonders bevorzugt, wenn der Antikörper (gegebenfalls gemäß Punkt e)) ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper ist.

30

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Zelle, ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn es sich bei
5 der Zelle (gegebenenfalls gemäß Punkt f)) um eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle handelt.

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verbindung (auch Anti-Sense etc.),
10 ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn es sich bei der Verbindung (gegebenenfalls gemäß Punkt g)) um eine niedermolekulare Verbindung handelt.

15 Dabei ist es für ein erfindungsgemäßes Arzneimittel, ein erfindungsgemäßes Diagnostikum und/oder eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn der genannte Wirkstoff gemäß Punkt h) ein niedermolekularer Wirkstoff ist.

20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in einem Teilverfahren das Protein oder Teilprotein in den Schritten (a) und (b) ausgewählt ist aus:

- der PIM-1-Kinase,
- einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer
25 der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnliches Polynukleotid kodiert,
- einem Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß
einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), oder einem dazu
30 zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnlichem Protein und/oder

- einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder deren Antisense Polynukleotide bindet,
- 5 - oder einem mindestens 10 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine

und in einem anderen Teilverfahren das Protein oder Teilprotein in den Schritten (a) und (b) ausgewählt aus:

10

- der PIM-2-Kinase,
- oder
- der PIM-3-Kinase,
- einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu
- 15 mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnliches Polynukleotid kodiert,
- einem Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß einer der Abbildungen 2b), 2d), 2f), oder einem dazu
- 20 zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnlichem Protein und/oder
- einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 2a), 2c)
- 25 oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide bindet,
- oder einem mindestens 10 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine

, wobei - meist anschließend - die Ergebnisse aus Schritt b) der

30 Teilverfahren differentiell verglichen werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung, insbesondere Schmerzbehandlung, eines nichthumanen Säugetieres oder Menschen, das oder der eine Behandlung von Schmerzen, insbesondere chronischer Schmerzen, benötigt, durch Verabreichung eines
5 erfindungsgemäßen Arzneimittels, insbesondere solche enthaltend eine erfindungsgemäße Substanz und/oder einen erfindungsgemäßen Wirkstoff.

Die Verabreichung kann beispielsweise in Form eines Arzneimittels wie oben beschrieben erfolgen.

10

Insgesamt ist eine wichtige Grundlage der Erfindung die Identifizierung schmerzregulierter Gene und Genfragmente. Darauf basiert das Screeningverfahren. Aber auch die Verwendung zur Diagnose oder Therapie bietet sich wie bereits ausgeführt an. Im folgenden werden
15 entsprechende Anwendungsmöglichkeiten und weitere Ausführungsbeispiele erläutert.

1. Therapie chronischer Schmerzen

Die mRNA-Expression der Kinasen wurde durch in-situ-Hybridisierung im
20 Rückenmarksgewebe untersucht. Im Rückenmark projizieren die primären sensorischen Neurone auf nachgeschaltete zentralnervöse Neurone, es handelt sich hierbei neben supraspinalen Vorgängen um die zentrale Umschaltstelle für nozizeptive Information. Zahlreiche Experimente konnten zeigen, daß der Entwicklung chronischer Schmerzzustände
25 plastische Veränderungen des Nervensystems zugrundeliegen (als Überblick siehe Corderre et al., 1993; Zimmermann und Herdegen, 1996). Insbesondere in den Neuronen der dorsalen Wurzelganglien und des Rückenmarks sind plastische Veränderungen beschrieben worden, die mit der Regulation schmerzrelevanter Gene einhergeht. So ist für eine Reihe
30 von Neurotransmitter-Rezeptoren, die für die Schmerztherapie von Bedeutung sind, eine Gen-Regulation im Rückenmark beschrieben worden (siehe Tabelle 1). Auf dieser Grundlage könnten die gefundenenen, unter

Schmerz regulierten cDNA-Sequenzen zur Therapie (Gentherapie, Antisense, Ribozyme) und Diagnose chronischer Schmerzzustände verwendet werden.

5 **1.1 Antisense-Strategien**

Hierbei werden, abgeleitet von der Nukleinsäuresequenz der vollständigen cDNA oder von Teilbereichen Konstrukte erstellt, die die mRNA oder Proteinkonzentration herabsetzen können. Dies können z.B. antisense-Oligonukleotide (DNA oder RNA) sein, die eventuell unter Verwendung
10 modifizierter Nukleotidbausteine (z.B. O-Allyl-Ribose) eine erhöhte Stabilität gegenüber Nukleasen aufweisen. Zudem ist die Verwendung von Ribozymen denkbar, die als enzymatisch aktive RNA-Moleküle eine spezifische Spaltung der RNA katalysieren. Daneben könnten auch Vektoren eingesetzt werden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen oder
15 Teilbereiche dieser Nukleotidsequenzen unter Kontrolle eines geeigneten Promotors exprimieren und somit für eine in-vivo oder ex-vivo Therapie geeignet sind. Zusätzlich sind auch Antisense-Konstrukte möglich, die unter Austausch des Phosphatrückgrats von Nukleotidsequenzen (z.B. PNAs, d.h. Peptide Nucleic Acids) oder Verwendung nichttraditioneller
20 Basen wie Inosine, Queosine oder Wybutosine sowohl wie Acetyl-, Methyl-, Thio- und ähnlich modifizierte Formen von Adenin, Cytidin, Guanosin u, Thymidin und Uridin nicht oder in geringerem Masse durch endogene Nukleasen abgebaut werden können.

25 **1.2. Antagonisten/ Agonisten bzw. Inhibitoren/Aktivatoren der im Screeningverfahren verwendeten erfindungsgemäßen Genprodukte.**

Dies umfaßt Substanzen, die durch eine Bindung an das Genprodukt dessen Funktion verändern. Dies können sein:

1.2.1. Organisch-chemische Moleküle, die im Rahmen eines
30 Wirkstoffscreenings unter Verwendung der Genprodukte der erfindungsgemäßen cDNA als Bindungspartner gefunden werden.

1.2.2. Antikörper, seien es polyklonale, chimäre, single-chain, F_{ab}-Fragmente oder Fragmente aus Phagen-Banken, die bevorzugt als neutralisierende Antikörper über eine Bindung an die Genprodukte spezifisch die Funktion beeinflussen.

- 5 1.2.3. Aptamere, d.h. Nukleinsäuren oder Nukleinsäurederivate mit Proteinbindenden Eigenschaften. Dazu gehören auch sog. Spiegelmere, die durch Spiegelevolution gewonnene spiegelbildliche und damit stabile Oligonukleotide darstellen, die hochaffin und hochspezifisch ein Zielmolekül binden können (Klußmann et al., 1996).

10

1.3. Gentherapie

- Die beschriebenen Sequenzen können zur Therapie neurologischer Erkrankungen insbesondere chronischer Schmerzzustände eingesetzt werden, indem sie nach Klonierung in geeignete Vektoren (z. B. Adenovirus-Vektoren oder adeno-assoziiertes-Virus-Vektoren) zur in vivo oder ex-vivo Therapie verwendet werden, um dort z.B. einer Überexpression oder Unterexpression des endogenen Genproduktes entgegenzusteuern, die Sequenz des defekten Genproduktes zu korrigieren (z. B. durch Transsplicing mit dem exogenen Konstrukt) oder
- 15
- 20 ein funktionelles Genprodukt zur Verfügung zu stellen.

2. Diagnose

- Polynukleotidsequenzen (Oligonukleotide, antisense -DNA & RNA-Moleküle, PNAs), die von den im Screeningverfahren etc. verwendeten Nukleotidsequenzen abgeleitet sind, könnten zur Diagnose von Zuständen oder Erkrankungen eingesetzt werden, die mit einer Expression dieser Gensequenzen assoziiert sind. Beispiele dieser Zustände oder Erkrankungen beinhalten neurologische Erkrankungen inklusive
- 25
- chronischer Schmerzen oder neuropathischer Schmerzen (hervorgerufen z.B. durch Diabetes, Krebs oder AIDS) oder neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Chorea Huntington, Jacob-
- 30

Creutzfeld, amyotrophe Lateralsklerose und Demenzen. Die Nukleotidsequenzen könne auf vielfältige Weise (Northernblot, Southernblot, FISH-Analyse, PRINS-Analyse, PCR) entweder zur Identifizierung der Genproduktes oder abweichender diagnostisch
5 relevanter Genprodukte oder zur Quantifizierung des Genproduktes dienen. Neben der Nukleinsäurediagnostik können auch Antikörper oder Aptamere gegen das von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodierte Protein zur Diagnostik eingesetzt werden (z. B. mittels ELISA, RIA, immuncytochemische oder immunhistochemische Verfahren), um das
10 Protein oder abweichende Formen zu identifizieren und das Protein zu quantifizieren.

Im Hinblick auf eine Gendiagnostik könnten Nukleinsäure-Sonden abgeleitet von den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen zur
15 Bestimmung des Gen-Lokus eingesetzt werden (z.B. durch FISH, FACS, artifizielle Chromosomen wie YACs, BACs oder P1-Konstrukte).

20

Die folgenden Beispiele und Abbildungen sollen die Erfindung erläutern, ohne sie darauf zu beschränken.

25

Abbildungen und Beispiele

Abbildungen:

30

Fig. 1a) cDNA-Sequenz von PIM1-Kinase, human; AN: NM_002648

Fig. 1b) Aminosäure-Sequenz von PIM1-Kinase, human; AN: NP_002639

Fig. 1c) cDNA-Sequenz von PIM1-Kinase, Ratte; AN: NM_017034

35 Fig. 1d) Aminosäure-Sequenz von PIM1-Kinase, Ratte; AN: NP_058730

- Fig. 1e) cDNA-Sequenz von PIM1-Kinase, Maus; AN: NM_008842
 Fig. 1f) Aminosäure-Sequenz von PIM1-Kinase, Maus; AN: NP_032868
 Fig. 2a) mRNA-Sequenz ähnlich zu PIM3-Kinase, human; AN: BC017083
 5 Fig. 2b) Aminosäure-Sequenz von PIM3-Kinase, human; AN:
 Fig. 2c) cDNA-Sequenz von PIM3-Kinase, Ratte; AN: NM_022602
 Fig. 2d) Aminosäure-Sequenz von PIM3-Kinase, Ratte; AN: NM_072124
 Fig. 2e) cDNA-Sequenz von PIM3-Kinase, Maus; AN: BC017621
 Fig. 2f) Aminosäure-Sequenz von PIM3-Kinase, Maus; AN: BC017621
 10 Fig. 3) mRNA-Expression der PIM-Kinasen im Lumbalmark der adulten Ratte. s. Beispiel 1a)
 Fig. 4) Veränderungen der PIM-1 Genexpression im Rückenmark (L5) nach Ischiadicus-Ligatur (Bennett); s. Beispiel 1b)
 15 Fig. 5) PIM-1 mRNA-Spiegel im Lumbalmark (L5) nach Bennett-Ligatur
 Quantitative Auswertung der *in situ*-Hybridisierungsergebnisse
 Fig. 6) mRNA-Expressionsmuster der PIM-Kinasen im Hinterhorn des Rückenmarks.
 Fig. 7) mRNA-Expression der PIM-Kinasen im Spinalganglion
 20 Fig. 8) Lokalisation der PIM-1 Genexpression im Spinalganglion (L6) der Ratte mit *in situ*-Hybridisierung
 Fig. 9) Veränderungen der PIM-1, PIM-2 und PIM-3 mRNA-Spiegel im Spinalganglion L6 nach bilateraler CFA-Arthritis
 Densitometrische Analyse der Ethidiumbromid-gefärbten
 25 Banden für PIM-1, PIM-2, PIM-3 und GAPDH nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte (25 Zyklen).
 Darstellung der Meßwerte als Quotient aus PIM-1 und GAPDH bzw. PIM-2/GAPDH bzw. PIM-3/GAPDH

30

Beispiele:

35

Beispiel 1 Identifizierung schmerzregulierter Gene

40

Es wurde folgendes Vorgehen gewählt:

Als Ausgangspunkt für die Isolierung schmerzregulierter Gene wurde
 45 das sogenannte Formalinmodell an der Ratte gewählt, bei dem Formalin in die Rattenpfote injiziert wird. Das Zielgewebe, in dem die schmerzregulierte

Expression der erfindungsgemäßen Gene nachgewiesen wurde, war der dorsale Teil des Rückenmarks der Ratte in den Segmenten L3-L6.

Tiermodell: Der Formalin-Test stellt ein geeignetes Modell für den Bereich des inflammatorischen/persistenten Schmerz dar (Duibisson et al., 1997). Hierbei wurde 50µl 5%ige Formalinlösung unilaterale in die Hinterpfote adulter Wistar-Ratten injiziert und die Tiere 24Std. nach der Injektion zur Gewebeentnahme getötet. Parallel wurden bei den Kontrolltieren isotonische Kochsalzlösung in die Hinterpfote injiziert.

10

Gewebeentnahme. Die Tiere werden dekapitiert, die Rückenwirbelsäule herauspräpariert, Schnitte des Rückenmarks angefertigt und mit spezifischen markierten Antikörpern gegen die PIM-Kinasen hybridisiert.

15

Beispiel 1a) zu Fig. 3)

Digitalisierte Röntgenfilmautoradiogramme von Gefrierschnitten durch das Rückenmark (Ebene L5) nach *in situ*-Hybridisierung mit spezifischen ³⁵S-markierten RNA-Sonden. Die Expositionszeit der Röntgenfilme betrug 72h. PIM-1 ist unter normalen Bedingungen relativ gering exprimiert (A). Im Vergleich dazu ist PIM-2 konstitutiv stark exprimiert (B) mit deutlicher Dominanz in der grauen Substanz (vor allem im oberflächlichen Hinterhorn und in den Motoneuronen des Vorderhorns). PIM-3 mRNA ist über den ganzen Schnitt verteilt (C), mit stärkeren Signalen über den neuronalen Bereichen und schwachen Signalen über der weißen Substanz.

20

25

Beispiel 1b) zu Fig. 4

Vestärkte PIM-1 Genexpression im Rückenmark nach Ischiadicus-Ligatur. Digitalisierte Gefrierschnitte durch das Lumbalmark von Tieren 7 Tage nach Bennett-Ligatur (B) zeigen nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten PIM-1 Sonde eine deutliche Erhöhung der PIM-1 mRNA-

30

Spiegel Rückenmarkshälfte ipsilateral zur Ligation (Pfeil), sowohl im Hinterhorn als auch im Vorderhorn. In Sham-operierten Tieren (A) wird diese Erhöhung nicht beobachtet

5 **Beispiel 1c) zu Fig. 5**

Semi-quantitative Analyse der PIM-1 mRNA Spiegel in den verschiedenen Rückenmarksregionen von Sham-operierten Tieren und von Tieren 7 Tage nach Bennett-Ligatur.

10 Nach Digitalisierung der mit einer PIM-1 spezifischen Sonde hybridisierten Gefrierschnitte (MCID Bildanalyse-System, Imaging Research, Canada) werden die radioaktiven Hybridisierungssignale densitometrisch erfaßt. Die Meßwerte werden nach Etablierung einer Standardkurve in nCi/g Gewebe umgewandelt.

15 Für die Etablierung einer Standardkurve werden Objektträger mit ¹⁴C-Plastikstreifen mit definiertem radioaktiven Gehalt (American Radiolabeled Chemical Inc.) gemeinsam mit den hybridisierten Schnitten auf Röntgenfilm für die gleiche Dauer exponiert.

Analysiert wurden jeweils die kontra- und ipsilaterale Regionen des Hinterhorns sowie des Vorderhorns.

20 Für die Gruppe der Sham-operierten Tiere wurden pro Region 9 Messungen, für die Gruppe nach Bennett-Ligatur 17 Messungen durchgeführt.

Beispiel 1d) zu Fig. 6

25 Hochauflösende Dunkelfeldaufnahmen des oberflächlichen Hinterhorns ipsilateral zur Ischiadicus-Ligatur nach Hybridisierung mit PIM-spezifischen Sonden (A,C, E) und Gegenfärbung mit Kresylviolett (B,D,F). PIM-1 hybridisierte Schnitte zeigen eine "layer"-spezifische Expression von PIM-1 in Lamina 2 und 3 (A,B). PIM-2 Transkripte sind besonders in Lamina 1
30 und Lamina und im gesamten Hinterhorn relativ stark exprimiert (D,E).

Hingegen ist PIM-3 weniger im oberflächlichen Hinterhorn, sondern in Lamina 3 und den tieferen Schichten exprimiert (E,F).

Beispiel 1e) zu Fig. 7

- 5 Digitalisierte Röntgenfilmautoradiogramme von Gefrierschnitten durch ein lumbales Spinalganglion (L6) nach *in situ*-Hybridisierung mit spezifischen ³⁵S-markierten RNA-Sonden. Die Expositionszeit der Röntgenfilme betrug 72h.
- Alle drei PIM-Kinasen sind unter normalen Bedingungen im Spinalganglion exprimiert (A,C,D). Sonden in sense-Orientierung, hier am Beispiel für PIM-1 gezeigt (B), produzieren keine spezifischen Hybridisierungssignale. PIM-3 ist im Vergleich stärker exprimiert (D).
- Für die RT-PCR- Analyse wurden die Spinalganglien (L6) aus 5 Kontrolltieren beiderseits entnommen und für die Extraktion der Gesamt-RNA gepoolt. Für die RNA-Extraktion wurde Trizol (Gibco-BRL) verwendet.
- 15 Vor Durchführung der reversen Transkription wurde eine Dnase I-Behandlung durchgeführt.
- Für die reverse Transkription mit Superscript II (Gibco-BRL) wurden 2,5 µg der isolierten Gesamt-RNA in einer 50 µl-Reaktion eingesetzt.
- 20 Die PCR-Amplifikation wurde in einem Thermocycler 9700 (Perkin Elmer) nach folgendem Programm durchgeführt:
- 1 Zyklus 95°C, 3 min; 40 Zyklen (94°C, 45 sec; 60°C, 45 sec; 72°C, 60 sec); 1 Zyklus 72°C, 7 min.
- Als Matrize wurde jeweils 7,5 µl der cDNA eingesetzt (50 ng/µl).
- 25 Die spezifischen Amplicons für PIM-2 (518 bp) und PIM-3 (612 bp) hatten die erwarteten Größen; GAPDH. Als Negativ-Kontrollen wurden RT-Reaktionen unter Weglassen der reversen Transkriptase durchgeführt.

Beispiel 1f) zu Fig. 8

Hybridisierung von Gefrierschnitten mit PIM-1 spezifischen Sonden zeigt spezifische Hybridisierungssignale über den zellreichen Regionen des Spinalganglions (Dunkelfeld aufnahme in A). Die mikroskopische Hochauflösung im Hellfeld bestätigt, daß die Signale in den Kresylviolett
5 gegengefärbten Schnitten primär über den neuronalen Zellen lokalisiert sind (B).

Beispiel 1g) zu Fig. 9

10 Aus 5 Tieren wurden beiderseits die Spinalganglien (L6) entnommen und für die Extraktion der Gesamt-RNA gepoolt.

Für die RNA-Extraktion wurde Trizol (Gibco-BRL) verwendet. Vor Durchführung der reversen Transkription wurde eine Dnase I-Behandlung durchgeführt.

15 Für die reverse Transkription mit Superscript II (Gibco-BRL) wurden 2,5 µg der isolierten Gesamt-RNA in einer 50 µl-Reaktion eingesetzt.

Die PCR-Amplifikation wurde in einem Thermocycler 9700 (Perkin Elmer) nach folgendem Programm durchgeführt:

1 cycle 95°C, 3 min; 40 cycles (94°C, 45 sec; 60°C, 45 sec; 72°C, 60 sec); 1 cycle 72°C, 7 min.

20 Als Matrize wurde jeweils 7,5 µl der cDNA eingesetzt (50 ng/µl).

Nach 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 40 Zyklen wurden jeweils 10 µl der PCR-Reaktion entnommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt, um den linearen Bereich der Amplifikation zu bestimmen. Die Ethidiumbromid-gefärbten Gele wurden digitalisiert und die PCR-Banden densitometrisch
25 gemessen.

Die spezifischen Amplicons hatten die erwarteten Größen (PIM-1, 550 bp; PIM-2, 518 bp; PIM-3, 612 bp; GAPDH, 227 bp).

Um die Veränderung der PIM-Expression nach CFA zu erfassen, wurden die Quotienten aus den spezifischen Amplicons (PIM-1, PIM-2, PIM-3) und
30 dem nicht regulierten GAPDH für jede Versuchsgruppe gebildet.

Umfassende Expressionsanalyse aller drei Mitglieder der Pim-Kinase-Familie: PIM1, PIM2 und PIM3

- 5 Die umfassende Expressionsanalyse aller drei Mitglieder der Pim-Kinase-Familie: PIM1, PIM2 und PIM3; wird im Folgenden tabellarisch dargestellt.

	PIM-1		PIM-2		PIM-3	
Expression	Neurone	Glia-zellen	Neurone	Glia-zellen	Neurone	Glia-zellen
Rückenmark	++	+	+++	+	+	+++
DRG	++	+	+++	+	+	+++

10 Die ISH-Ergebnisse zeigen folgende Expressionsmuster für die PIM-Kinasen:

- Eine neuronale Lokalisation von PIM-1, PIM-2 und PIM-3 mRNA im Rückenmark (ISH, RT-PCR)
- Eine neuronale Expression von PIM-1, PIM-2 und PIM-3 mRNA im DRG der Ratte. PIM-2 und PIM-3 scheinen auch in nicht-neuronalen Zellen vorzukommen. Die immunhistochemischen Daten zeigen das PIM-1 Protein in DRG-Neuronen und das PIM-2 Protein in DRG-Neuronen sowie in Gliazellen.

15 Für PIM-1 war eine erhöhte mRNA Expression in mehreren Schmerzmodellen nachweisbar:

- 20 • Hochregulation der PIM-1 mRNA in DRG-Extrakten im CFA-Modell
- Hochregulation von PIM-1 mRNA im Dorsalhorn nach Ischiadicus-Ligatur der Ratte. Daneben findet man auch in Motoneuron-Arealen des Vorderhorns eine Hochregulierung.
- PIM1 im neuropathischen Schmerz Hochregulation in Mikroglia (C1q) und in Neuronen
- 25 • Im Gegensatz zu PIM-1 ist PIM-2 schon konstitutiv im Hinterhorn recht stark exprimiert, wobei die im Bennett-Modell beobachtete geringe Hochregulation nach statistischer Auswertung nicht signifikant war.

- Zunahme der neuronalen PIM-1 Immunreaktivität im Hinterhorn im Chung-Modell.
- Die PIM-3 mRNA wird im tieferen Hinterhorn als auch im Vorderhorn sowohl neuronal als auch glial exprimiert, nach Läsion aber nicht reguliert.

Beispiel 2:

Durchführung des Screeningverfahrens mit Messung der Bindung über die Verdrängung eines radioaktiv markierten Liganden

10

Ein Nukleinsäureabschnitt, der für die PIM1-Kinase kodiert, wird in einem Expressionsvektor kloniert, der eine konstitutive Expression (z.B. CMV-Promoter) oder eine induzierbare Expression in eukaryonten Zellen erlaubt. Die DNA wird mit geeignetem Transfektionsverfahren, z.B. mit Lipofectamin (Fa. Roche Diagnostics) in eukaryontischen Zellen (z.B. CHO-Zellen, HEK293-Zellen oder NIH-3T3-Zellen) hineingebracht. Die Zellen werden in Anwesenheit eines Selektionsreagenzen (z.B. Zeocin, Hygromycin oder Neomycin) kultiviert so daß nur die Zellen überleben, die das DNA-Konstrukt aufgenommen haben, und bei länger andauernder Selektion, auch in das Genom inkorporiert haben.

15

20

25

30

Ausgehend von diesen Zellen werden Membranfraktionen gewonnen, die die PIM1-Kinase in großer Menge enthalten und für einen Bindungsassay verwendet werden können. Dieser besteht aus 1.) dem PIM1-Kinase enthaltenden Membranen 2.) einem radioaktiv markierten Liganden 3.) einem Bindungspuffer (z.B. 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA) und dem auf Bindung zu untersuchenden Liganden. Nach Inkubation der oben genannten Reaktionsgemische (für z.B. 30-60 min) bei einer geeigneten Temperatur (meistens Raumtemperatur) werden die nichtgebundenen radioaktiven Ligandenmoleküle abfiltriert. Die Restmenge an gebundenem Liganden wird nach Zugabe eines Szintillationscocktails in einem β -Counter (z.B. Trilux, Fa. Wallac) vermessen. Zeigt die Testsubstanz eine

Bindung an die PIM1-Kinase, so wird dies als verringerter radioaktiver Einbau detektiert. Dieses Verfahren wird geeignetermaßen so miniaturisiert, daß es in (96-, 384- oder 1536-well) Mikrotiterplatten durchgeführt werden kann, um dieses Verfahren mittels eines Roboters im
5 sogenannten Highthroughput-Screening (HTS)-Verfahren durchzuführen.

Beispiel 3:

**Durchführung des erfindungsgemäßen Screeningverfahrens mit
Messung der durch die Bindung der Substanz veränderten
10 funktionellen Parameter**

Ein Nukleinsäureabschnitt, der für die Proteinkinase PIM-1 kodiert, wird in einem Expressionsvektor kloniert, der eine induzierbare Expression in Prokaryonten, wie z.B. E.coli erlaubt. Hierbei wird der
15 Nukleinsäureabschnitt so modifiziert, daß er als Fusionsprotein mit einer zusätzlichen N- oder C-terminalen Aminosäuresequenz exprimiert wird. Diese Sequenz sollte bei unveränderter Funktion der PIM-1 Kinase eine Aufreinigung über ein spezifisches Verfahren erlauben, z.B. Glutathion S-Transferasefragment, das über Bindung an Glutathion eine Isolierung aus
20 dem Proteingemisch erlaubt. Nach Transfektion der Bakterien, Induktion des Genes (z.B. mit IPTG beim lac-Promoter) und Aufschließen der Bakterien werden die Fusionsproteine aufgereinigt und in einem in vitro-Kinase Experiment eingesetzt. Hierbei werden 5 µg Protein bei 30°C für 30 Minuten in 50 µl Kinasepuffer (20 mM PIPES, pH 7.0, 5 mM MnCl₂, 7 mM
25 β-Mercaptoethanol, 0.4 mM Spermin, 10 mM rATP) ergänzt mit 10 µCi [γ -³²P] ATP. Als Substrate werden gereinigtes Histon H1-Protein (Fa. Sigma) oder bakteriell exprimiertes GST-NFATc1-Fusionsprotein hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wird das nicht-inkorpierte [γ -³²P] ATP abfiltriert und die Menge an eingebautem ³²Phosphat durch β-
30 Szintillation (Trilux, Fa. Wallac) bestimmt. In einem Experiment zum Aufspüren neuer PIM-1 Kinase-Inhibitoren werden in diesem Ansatz die

Testsubstanzen mitinkubiert und eine Abnahme der ^{32}P -Inkorporation als Indikator für einen Inhibitor benutzt. Dieses Verfahren wird geeignetermaßen so miniaturisiert, daß es in (96-, 384- oder 1536-well) Mikrotiterplatten durchgeführt werden kann, um dieses Verfahren mittels
 5 eines Roboters im sogenannten Highthroughput-Screening (HTS)-Verfahren durchzuführen.

Beispiel 4:

10 Beispiel für ein Arzneimittel enthaltend eine erfindungsgemäße Verbindung - Tablettenformulierung

Tabletten können durch direktes Verpressen von Mischungen der erfindungsgemäßen Verbindung mit entsprechenden Hilfsstoffen oder durch
 15 Verpressen von verbindungshaltigen Granulaten (mit gegebenenfalls weiteren Hilfsstoffen) hergestellt werden. Die Granulate können dabei entweder durch Feuchtgranulation mit z.B. wäßrigen Granulierflüssigkeiten und anschließender Trocknung dieser Granulate oder durch Trockengranulation z.B. über Kompaktierung hergestellt werden.

20

▪

Direktverpressung

	z.B. pro Tablette:	25 mg	erfindungsgemäße Verbindung
		271 mg	LudipressTM (Granulat zur Direkttablettierung aus Lactose monohydrat, Povidon K30 und Crospovidon)
25		4 mg	Magnesiumstearat
		300 mg	Gesamt

30

Homogene Mischung des Wirkstoffes mit den Hilfsstoffen herstellen und diese auf einer Tablettenpresse zu Tabletten mit einem Ø von 10 mm verpressen.

5

▪ Trockengranulation

	z.B. pro Tablette:	25 mg	erfindungsgemäße Verbindung
		166 mg	Microcristalline Cellulose
10		80 mg	Niedrig substituierte Hydroxypropylcellulose (I-HPC LH 11 TM)
		5 mg	Hochdisperses Siliziumdioxid
		4 mg	Magnesiumstearat
15		280 mg	Gesamt

Homogene Mischung der Verbindung mit der Mikrokristallinen Cellulose und der I-HPC herstellen und diese Kopaktieren. Nach dem Sieben der Komprimat wird das entstandene Granulat mit Magnesiumstearat und Siliziumdioxid gemischt und auf einer Tablettenpresse zu Tabletten mit einem Ø von 9 mm verpreßt.

20

▪ Feuchtgranulation

25

	z.B. pro Tablette:	25 mg	erfindungsgemäße Verbindung
		205 mg	Mikrokristalline Cellulose
		6 mg	Povidon K30
		10 mg	Crospovidon
30		4 mg	Magnesiumstearat
		250 mg	Gesamt

5 Homogene Mischung der Verbindung mit der Mikrokristallinen Cellulose und dem Crospovidon herstellen und diese in einem Granulator mit einer wäßrigen Lösung des Povidons granulieren. Das feuchte Granulat wird anschließend nachgranuliert und nach der Trocknung im Trockenschrank (50°C) 10 h getrocknet. Das trockene Granulat wird mit dem Magnesiumstearat zusammen gesiebt, endgemischt und auf einer Tablettenpresse zu Tabletten mit einem Ø von 8 mm verpreßt.

10

Beispiel 5:**Beispiel für ein Arzneimittel enthaltend eine erfindungsgemäße Verbindung – parenterale Lösung**

15 1 g einer erfindungsgemäßen Verbindung wird in 1 l Wasser für Injektionszwecke bei Raumtemperatur gelöst und anschließend durch Zugabe von NaCl (Natriumchlorid) auf isotone Bedingungen eingestellt.

Literatur:

- Akopian AN, Sivilotti L & Wood JN (1995) *Nature* 379: 257-262
- Ausubel FM, Brent R, Kingdon RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA &
5 Struhl K eds.(1190) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley
&Sons, Inc. New York, NY.
- Baba H, Doubell TP, Woolf CJ 1999: Peripheral inflammation facilitates A β
fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat
spinal cord. *J Neurosci* 19: 859-867
- 10 Bauer D, Müller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P & Strauss M
(1993): Identification of differentially expressed mRNA species by an
improved display technique (DDRT-PCR) *Nucl Acids Res* 21: 4272-4280.
- Bonini A, Anderson SM, Steiner DF (1997) Molecular cloning and tissue
expression of a novel orphan G Protein-coupled receptor from rat lung.
15 *Biochem Biophys Res Comm* 234: 190-193.
- Chih-Cheng et al., (1995): A P2X prinoceptor expressed by a subset of
sensory neurons. *Nature* 377:428-432
- Corderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R (1993): Contribution of
central plasticity to pathological pain: review of clinical and experimental
20 evidence. *Pain* 52: 259-285.
- Dickenson (1995) Novel pharmacological targets in the treatment of pain.
Pain Rev., 2, 1-12.
- Dubuisson et al., 1997 *Pain*, 4:161-174.
- Feng Y & Gregor P (1997) Cloning of a novel member of the G Protein-
25 coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochem Biophys Res*
Comm 231: 651-654.
- Furukawa T, Yang Y, Nakamoto B, Stamatoyannopoulos G,
Papayannopoulou T (1996): Identification of new genes expressed in a
human erythroleukemia cell line. *Bloods Cell Mol & Dis* 22:11-22.

- Gunasekar PG, Kanthasamy, AG, Borowitz JL, Isom GE 1995: NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *J Neurochem* 65: 2016-2021.
- 5 Hawes BE, Fried S, Yao X, Weig B, Graziano MP 1998: Nociceptin (ORL1) and μ -Opioid receptors mediate mitogen-activated protein kinase activation in CHO cells through a Gi-coupled signaling pathway: evidence for distinct mechanisms of agonist-mediated desensitization. *J Neurochem* 71: 1024-1033.
- 10 Hubank M & Schatz DG (1994): Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucl Acids Res* 22: 5640-5648.
- Klußmann S et al., 1996: *Nature Biotechnology* 14: 1112-1115.
- Li L-Y & Chang K-J 1996: The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in chinese hamster ovary cells transfected to express μ -opioid receptors. *Mol Pharm* 50:599-602.
- 15 Liang P & Pardee AB 1992: Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
- Methner A, Hermey G, Schinke B, Hermanns-Borgmeyer I (1997): A novel G Protein-coupled receptor with homology to neuropeptide and chemoattractant receptors expressed during bone development. *Biochem Biophys Res Comm* 233: 336-342.
- 20 Mohit AA, Martin JH & Miller CA 1995: p493F12 Kinase: a novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system.
- 25 Neuron 14: 67-78.
- Poirier GM-C, Pyati J, Wan JS, Erlander MG 1997: Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. *Nucleic Acids Research* 25: 913-914.

- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T 1989: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- 5 Sompayrac L, Jane S, Burn TC, Tenen DG & Danna KJ 1995: Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. Nucleic Acids Research 23: 4738-4739.
- Tal M 1996: A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful neuropathy. Neurreport 7: 1382-1384.
- 10 Tölle TR (1997): Chronischer Schmerz. In: Klinische Neurobiologie, Herdergen T, Tölle TR, Bähr M (Hrsg.): S. 307-336; Spektrum Verlag, Heidelberg.
- U.S.Patent 5.262.311
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995): Serial analysis of gene expression. Science 270: 484-487.
- 15 Wan JS, Sharp JS et al. (1996): Cloning differentially expressed mRNAs Nature Biotech 14:1685-1691.
- Watson JB & Margulies JE (1993) Differential cDNA screening strategies to identify novel stage-specific proteins in the developing mammalian brain. Dev Neurosci 15: 77-86.
- 20 Wilks AF (1989) Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 86: 1603-1607.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE 1992: Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. Nature 355:75-78.
- 25 Zimmermann, M & Herdegen, T (1996): Plasticity of the nervous system at the systemic, cellular and molecular levels: a mechanism of chronic pain and hyperalgesia. Progr Brain Res 110: 233-259

Patentansprüche

1. Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen mit
5 folgenden Verfahrensschritten:
- (a) Inkubation einer zu testenden Substanz unter geeigneten
Bedingungen mit einer Zelle und/oder einer Präparation
aus einer solchen Zelle, die das Protein PIM-1-Kinase oder
10 PIM-3-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der
Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder ein zu
einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 %
ähnliches Protein und/oder ein Protein, für das ein
Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e),
15 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 %
ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das
durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten
Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der
Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren
20 Antisense Polynukleotide binden, oder ein mindestens 10
Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten
Proteine synthetisiert hat,
- (b) Messung der Bindung der Testsubstanz an dem von der
Zelle synthetisierten Protein oder Teilprotein oder Messung
25 mindestens eines der durch die Bindung der Testsubstanz
an das Protein oder Teilprotein veränderten funktionellen
Parameter.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die
30 Zelle vor dem Schritt (a) gentechnisch manipuliert wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die gentechnische Manipulation die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter erlaubt.
- 5 4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß durch die gentechnische Manipulation eine in der Zelle nicht endogen exprimierte Form eines G-Proteins exprimiert oder ein Reportergen eingeführt wird.
- 10 5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle gentechnisch so manipuliert wird, daß die Zelle mindestens ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid enthält.
- 15 6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynukleotid in einem rekombinanten DNA-Konstrukt enthalten ist.
- 20 7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle nach der gentechnischen Manipulation gemäß Anspruch 2 und vor dem Schritt (a) gemäß Anspruch 1 unter Bedingungen, die eine Expression erlauben, kultiviert wird, gegebenenfalls unter Selektionsdruck.
- 25 8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle ist.
- 30 9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Messung der Bindung über die Verdrängung eines bekannten markierten Liganden des Teilproteins oder Proteins

und/oder über die daran gebundene Aktivität einer markierten Testsubstanz erfolgt.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch
5 gekennzeichnet, daß die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter über Messung der Regulation, Hemmung und/oder Aktivierung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen erfolgt, insbesondere über Messung der Veränderung der Genexpression, des Ionenmilieus, des pH oder
10 des Membranpotentials, über Veränderung der Enzymaktivität oder der Konzentration der 2nd messenger.
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein oder Teilprotein in den Schritten (a) und (b) ausgewählt ist aus:
15
- der PIM-1-Kinase,
 - einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu
20 mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnliches Polynukleotid kodiert,
 - einem Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), oder einem dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnlichem Protein und/oder
25
 - einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder deren Antisense Polynukleotide bindet,
 - oder einem mindestens 10 Aminosäuren langen
30 Teilprotein eines der vorgenannten Proteine.

12. Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 2a) und 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht.
- 5 13. Polynukleotid, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein Antisense Polynukleotid oder PNA handelt, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an ein Polynukleotid gemäß Anspruch 12 zu binden.
- 10 14. Vektor enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13.
- 15 15. Protein kodiert durch ein Polynukleotid gemäß Anspruch 12.
16. Protein, für das ein Polynukleotid kodiert, daß unter stringenten Bedingungen mit einem der Polynukleotide gemäß Abbildung 2a) oder 2e) oder deren Antisense-Polynukleotid hybridisiert.
- 20 17. Protein, welches einer der in einer der Abbildungen 2b) oder 2f) dargestellten Aminosäuresequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht.
18. Antikörper gegen ein Peptid oder Protein gemäß einem der Ansprüche 15 – 17.
- 25 19. Zelle enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13, ein Peptid oder Protein gemäß einem der Ansprüche 15 – 17 und/oder einen Vektor gemäß Anspruch 14.
- 30 20. Transgenes nichthumanes Säugetier, dessen Keim- und somatische Zellen eine Nukleotidsequenz gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13 als Resultat einer chromosomalen Einbringung in das Genom des

Tieres oder das Genom eines der Vorfahren des genannten Tieres enthalten.

- 5 21. Transgenes nichthumanes Säugetier, dessen Keim- und somatische Zellen als Resultat einer chromosomalen Manipulation im Genom des Tieres oder im Genom eines der Vorfahren des genannten Tieres eine der Nukleotidsequenzen gemäß Anspruch 12 nicht mehr in exprimierbarer Form enthalten.
- 10 22. Transgenes nichthumanes Säugetier gemäß einem der Ansprüche 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Nagetier ist.
- 15 23. Verbindung identifizierbar als schmerzregulierende Substanz durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-11 und 43.
24. Verbindung gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung durch ein Verfahren gemäß Anspruch 11 oder 43 als schmerzregulierende Substanz identifizierbar ist.
- 20 25. Arzneimittel enthaltend mindestens
- 25 a. ein Polynukleotid kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 30 b. ein Polynukleotid, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. einen Vektor enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)

- 5 d. eine PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der 10 Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder ein mindestens 10 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine,
- 15 e. einen Antikörper gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. eine Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- 20 g. eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 23 oder 24 und/oder
- h. einen Wirkstoff, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,
- 25 sowie gegebenenfalls geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
26. Diagnostikum enthaltend mindestens
- 30 a. ein Polynukleotid kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten

- Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 5 b. ein Polynukleotid, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. einen Vektor enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- 10 d. eine PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder ein Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 %
- 15 ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder ein mindestens 10
- 20 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine,
- e. einen Antikörper gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. eine Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- 25 g. eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 23 oder 24 und/oder
- 30 h. einen Wirkstoff, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

sowie gegebenenfalls geeignete Zusatzstoffe.

27. Verwendung

- 5 a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 10 b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- 15 d. einer PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Proteins und/oder
- 20 eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß
- 25 einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder eines mindestens 10 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine,
- e. eines Antikörpers gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- 30 f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein

oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)

- g. einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 23 oder 24 und/oder
- 5 h. eines Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Schmerz.

- 10 28. Verwendung gemäß Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung chronischen, insbesondere neuropathischen oder entzündungsbedingten Schmerz betrifft.

- 15 29. Verwendung

- a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 20 b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- 25 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b) oder einen Vektor gemäß Punkt c)

- 30 für die Gentherapie.

30. Verwendung gemäß Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um In-vivo oder In-vitro Gentherapie handelt.

31. Verwendung

5

a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3- Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,

10

b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,

15

c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)

d. einer PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder eines mindestens 10 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine,

20

25

30

e. eines Antikörpers gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),

- f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- 5 g. einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 23 oder 24 und/oder
- h. eines Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,
- 10 für die Diagnostik und/oder für Wirksamkeitsuntersuchungen.

32. Verwendung

- 15 a. eines Polynukleotids kodierend für PIM1- Kinase oder PIM3-Kinase oder eines Polynukleotids, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 20 b. eines Polynukleotids, insbesondere Antisense Polynukleotid oder PNA, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b)
- 25 d. einer PIM-1-Kinase oder PIM-3-Kinase und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b), 2d) oder 2f) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches
- 30 Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c)

- oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide binden oder eines mindestens 10 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine,
- 5 e. eines Antikörpers gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle enthaltend eine Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- 10 in einem Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen.
33. Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29, 31 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynukleotid gemäß Punkt a)
- 15 ein Polynukleotid kodierend für PIM1-Kinase oder ein Polynukleotid, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht, ist
- 20 und/oder
- das Protein gemäß Punkt d) eine PIM-1-Kinase und/oder ein Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d) oder 1f) und/oder ein zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein
- 25 und/oder ein Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder ein Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder
- 30 deren Antisense Polynukleotide binden oder ein mindestens 10 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine ist.

34. Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29, 31 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynukleotid (gegebenfalls gemäß Punkt a) und/oder Punkt b)) eine RNA oder eine ein- oder doppelstängige DNA, insbesondere mRNA oder cDNA ist.
35. Polynukleotid gemäß Anspruch 13, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29, 31 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynukleotid (gegebenfalls gemäß Punkt b)) Teil eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA ist.
36. Vektor gemäß Anspruch 14, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29, 31 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor (gegebenfalls gemäß Punkt c)) ein Expressionsvektor ist.
37. Vektor gemäß Anspruch 14, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29, 31 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor (gegebenfalls gemäß Punkt c)) abgeleitet ist von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder er mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz enthält.
38. Protein oder Teilprotein gemäß einem der Ansprüche 15 - 17, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein oder Teilprotein (gegebenfalls gemäß Punkt d)) posttranslational modifiziert wurde, es

insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde.

- 5 39. Antikörper gemäß Anspruch 18, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (gegebenenfalls gemäß Punkt e)) ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper ist.
- 10
40. Zelle gemäß Anspruch 19, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27, 29, 31 und/oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Zelle (gegebenenfalls gemäß Punkt f)) um eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine
- 15 immortalisierte oder native Säugetierzelle handelt.
41. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 23 oder 24, Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27 und/oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Verbindung (gegebenenfalls gemäß Punkt g)) um eine niedermolekulare Verbindung handelt.
- 20
42. Arzneimittel gemäß Anspruch 25, Diagnostikum gemäß Anspruch 26, Verwendung gemäß einem der Ansprüche 27 und/oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß der genannte Wirkstoff gemäß Punkt h) ein niedermolekularer Wirkstoff ist.
- 25
43. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß in einem Teilverfahren das Protein oder Teilprotein in den Schritten (a) und (b) ausgewählt ist aus:
- 30 - der PIM-1-Kinase,

- einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnliches Polynukleotid kodiert,
- 5 - einem Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), oder einem dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnlichem Protein und/oder
- einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert
10 wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c) oder 1e) oder deren Antisense Polynukleotide bindet,
- oder einem mindestens 10 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine

15

und in einem anderen Teilverfahren das Protein oder Teilprotein in den Schritten (a) und (b) ausgewählt ist aus:

- der PIM-2-Kinase,
- 20 oder
- der PIM-3-Kinase,
- einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 2a), 2c) oder 2e) oder ein dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere
25 97%, ähnliches Polynukleotid kodiert,
- einem Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß einer der Abbildungen 2b), 2d), 2f), oder einem dazu zu mindestens 90 %, vorzugsweise 95%, insbesondere 97%, ähnlichem Protein und/oder
- 30 - einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein

- Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 2a), 2c) oder 2e) oder deren Antisense Polynukleotide bindet,
- oder einem mindestens 10 Aminosäuren langen Teilprotein eines der vorgenannten Proteine

5

und die Ergebnisse aus Schritt b) der Teilverfahren differentiell verglichen werden.

10

Fig. 1a)

```

1      gaggaggccc gagaggagtc ggtggcagcg gcggcgccgg gaccggcagc agcagcagca
61     gcagcagcag caaccactag cctcctgccc cgcgccgttg cgacgagccc cagcagccgc
121    tcaccccgcc gttctcagcg ctgcccgacc ccgctggcgc gcctcccgcc gcagtcccg
181    cagcgcctca gttgtcctcc gactcgccct cggccttcgc gcagcgcagc acagccgcac
241    gcaccgcagc acagcacagc acagcccagg catagcttcg gcacagcccc ggctccggct
301    cctgcggcag ctctctggc acgtccctgc gccgacattc tggaggttg atgctcttgt
361    ccaaaatcaa ctgccttgcc cacctgcgcg ccgcgccctg caacgacctg cagccacca
421    agctggcgcc cggcaaggag aaggagcccc tggagtcgca gtaccaggtg ggcccgtac
481    tgggcagcgg cggcttcggc tcggtctact caggcatccg cgtctccgac aacttgccgg
541    tggccatcaa acacgtggag aaggaccgga tttccgactg gggagagctg cctaattggca
601    ctcgagtgcc catggaagtg gtccctgtga agaaggtgag ctcggttttc tccggcgta
661    ttaggtcctt ggactggttc gagaggcccg acagtttcgt cctgatcctg gagaggcccg
721    agccggtgca agatctcttc gacttcacat cggaaggagg agccctgcaa gaggagctgg
781    cccgcagctt cttctggcag gtgctggagg ccgtgcggca ctgccacaac tgcggggtgc
841    tacaccgca catcaaggac gaaaacatcc ttatcgacct caatcgcgcc gagctcaagc
901    tcactgactt cgggtcgggg gcgctgctca aggacaccgt ctacacggac ttcgatggga
961    cccgagtgtg tagccctcca gagtggatcc gctaccatcg ctaccatggc aggtcggcgg
1021   cagtctggtc cctggggatc ctgctgtatg atatggtgtg tggagatatt cctttcgagc
1081   atgacgaaga gatcatcagg ggccaggttt tcttcaggca gagggtctct tcagaatgtc
1141   agcatctcat tagatgggtg ttggccctga gaccatcaga taggccaacc ttcgaagaaa
1201   tccagaacca tccatggatg caagatgttc tcctgcccc ggaaactgct gagatccacc
1261   tccacagcct gtcgcggggg ccagcaaat agcagccttt ctggcaggtc cctccctctc
1321   ttgtcagatg cccgaggggg gggaagcttc tgtctccagc ttcccagta ccagtgcac
1381   gtctcgccaa gcaggacagt gcttgataca ggaacaacat ttacaactca ttccagatcc
1441   caggcccttg gaggtgcct cccaacagtg gggaagagtg actctccagg ggtcctaggc
1501   ctcaactcct cccatagata ctctcttctt ctcataggtg tccagcattg ctggactctg
1561   aaatatcccg ggggtggggg gtgggggtgg gcagaaccct gccaatggaa ctctttcttc
1621   atcatgagtt ctgctgaatg ccgcgatggg tcaggtaggg gggaaacagg ttgggatggg
1681   ataggactag cacattttaa gtccctgtca cctcttccga ctctttctga gtgccttctg
1741   tggggactcc ggctgtgctg ggagaaatac ttgaacttgc ctcttttacc tgcctctct
1801   ccaaaaatct gcctgggttt tgttccctat ttttctctcc tgcctccct caccctctc
1861   ttcatatgaa aggtgccatg gaagaggcta cagggccaaa cgctgagcca cctgcccttt
1921   tttctgcctc ctttagtaaa actccgagtg aactggtctt cctttttggg ttttacttaa
1981   ctgtttcaaa gccaaagacct cacacacaca aaaaaatgca caaaccaagc aatcaacaga
2041   aaagctgtaa atgtgtgtac agttggcatg gtagtatata aaaagattgt agtggatcta
2101   atttttaaga aattttgcct ttaagttatt ttacctgttt ttgtttcttg ttttgaaaga
2161   tgcgcattct aacctggagg tcaatgttat gtattttatt atttatttat ttggttccct
2221   tcctattcca agcttccata gctgctgccc tagttttctt tcctcctttc ctctctgac
2281   ttggggacct tttgggggag ggctgcgacg cttgctctgt ttgtgggggtg acgggactca
2341   ggcgggacag tgcgcagct ccctggcttc tgtggggccc ctcacctact taccaggtg
2401   ggtcccggtc ctgtgggtga tgggaggggc cattgctgac tgtgtatata ggataattat
2461   gaaacacagt tctggatggt gtgccttcca gatcctctct ggggctgtgt tttgagcagc
2521   aggtagcctg ctggttttat ctgagtgaat tactgtacag gggaataaaa gagatcttat
2581   ttttttttta tacttgcggt tgggaataaaa accctttggc ttt

```

Fig. 1b)

```
1      mllskinsla hlraapcndl hatklapgke keplesqyqv gpllgsgggfg svysgirvsd
61     nlpvaikhve kdriwdgel pngtrvpmev vllkkvssgf sgvirlldwf erpdsfvlil
121    erpepvqdlf dfitergalq eelarsffwq vleavrhchn cgvlhrdikd enilidlrg
181    elklidfgsg allkdtvytd fdgtrvyspp ewiryhryhg rsaavwslgi llydmvcgdi
241    pfehdeeiir gqvffrqrvs secqhlirwc lalrpsdrpt feeiqnhpwm qdvllpqeta
301    eihlhlslspg psk
```

Fig. 1c)

```
1      gggatgctct tgtccaagat caactccttg gccacactgc gcgcagcccc ttgcaacgac
61     ctgcacgcca acaagctggc gccgggcaaa gagaaggagc ccttggagtc gcagtaccag
121    gtgggcccgc tgttgggcag cgggtggcttc ggctcggctc actcgggcat ccgcgtcgcc
181    gacaaacttg cgggtggccat caagcacgtg gagaaggacc ggatttcoga ctgggggggaa
241    ctgcccacg gcacccgagt gcccatggaa gtggtcctgc tgaagaaggc gagctcgggc
301    ttctcggggc tcattagact tctggactgg ttcgagaggc ccgatatgtt cgtgctgatc
361    ctggagaggc ccgaaccgct gcaagacctc ttcgacttca tcaccgagcg aggagccctc
421    caggaggagc tggcccggag cttcttcttg cagggtgctg aggccgtgcg gcattgccac
481    aactgcgggg ttctccaccg cgacatcaag gacgagaaca tcttaatcga cctgaaccgc
541    ggcgaactca aactcatcga cttcgggtcg ggggcgctgc tcaaggacac agtctacacg
601    gactttgacg gaacccgagt gtacagtcct ccagagtgga ttcgctacca tcgctaccac
661    ggcaggctcg ctgctgtttg gtccctgggg atcctgctct atgacatggc ctgcggagat
721    attccatttg agcacgacga agagatcgtc aagggccaaag tgtacttttag gcaaagggtc
781    tcttcagaat gtcaacatct tattagatgg tgcctgtccc tgagaccatc ggaccggccc
841    tcctttgaag aaatccagaa ccatccgtgg atgcaggatg ttctcctgcc ccaggccacc
901    gccgagattc atctgcacag cctgtcacca tcaccagca aatagcagcc attctgtcag
961    accctccagg gaagagagag cttgtctgct ggccccaac aggaccctgc tctacgatgc
1021   agggacagaa atgacaactc attccaggct ccgggggtccc tggagcaacc tccctcaagg
1081   agaagagact agttcactcg tcctggacct cgctttgccc ctacagact cagtggcgctc
1141   cagtgtggct ggcgtccgca ggtcccggg tgttgggggg ggagggtggga gtgggtcaga
1201   gccctgtcat ggaactttag tcaccatgga gactgtgggt caccaagatg ggccagggta
1261   ggggaaaaaac atttgggggg tgggattaaa aactagcacc at
```

Fig. 1d)

```
1      mllskinsla hlraapcndl hanklapgke keplesqyqv gpllgsgggfg svysgirvad
61     nlpvaikhve kdrisdwgel pngtrvpmev vllkkvssgf sgvirllldwf erpdsfvlil
121    erpepvqdlf dfitergalq eelarsffwq vleavrhchn cgvlhrdikd enilidlnrg
181    elklidfgsg allkdtvytd fdgtrvyspp ewiryhryhg rsaavwslgi llydmvcgdi
241    pfehdeeivk ggvyfrqrvs secqhlirwc lslrpsdrps feeiqnhpwm qdvllpqata
301    eihlhlslsps psk
```

Fig. 1e)

```
1   atgctcctgt ccaagatcaa ctccctggcc cacctgcgcg cccgcccctg caacgacctg
61  cacgccacca agctggcgcc gggcaaagag aaggagcccc tggagtcgca gtaccaggtg
121 ggcccgcctgt tgggcagcgg tggcttcggc tcggtctact ctggcatccg cgtcgccgac
181 aacttgccgg tggccattaa gcacgtggag aaggaccgga tttccgattg gggagaactg
241 cccaatggca cccgagtgcc catggaagtg gtccctgttg agaaggtgag ctcggaactc
301 tcgggcgtca ttagacttct ggactggttc gagaggcccg atagtttcgt gctgacctg
361 gagaggcccg aaccggtgca agacctcttc gactttatca ccgaacgagg agccctacag
421 gaggacctgg cccgaggatt cttctggcag gtgctggagg ccgtgcggca ttgccacaac
481 tgcgggggtc tccaccgcga catcaaggac gagaacatct taatcgacct gagccgcggc
541 gaaatcaaac tcatcgactt cgggtcgggg gcgctgctca aggacacagt ctacacggac
601 tttgatggga cccgagtgtg cagtcctcca gagtggattc gctaccatcg ctaccacggc
661 aggtcggcag ctgtctggtc ccttgggata ctgctctatg acatggtctg cggagatatt
721 ccgtttgagc acgatgaaga gatcatcaag ggccaagtgt tcttcaggca aactgtctct
781 tcagagtgtc agcaccttat taaatgggtc ctgtccctga gaccgtcaga tcggccctcc
841 tttgaagaaa tccggaacca tccgtggatg cagggtgacc tcctgccccca ggcagcttct
901 gagatccatc tgcacagtct gtcaccggga tccagcaagt ag
```

Fig. 1f)

```
1      mllskinsla hlrarpcndl hatklapgke keplesqyqv gp1lgsggfg svysgirvad
61     nlpvaikhve kdrisdwgel pngtrvpmev vllkkvssdf sgvirlldwf erpdsfvlil
121    erpepvqdlf dfitergalq edlargffwq vleavrhchn cgvlhrdikd enilidlrg
181    eiklidfgsg allkdtvytd fdgtrvyspp ewiryhryhg rsaavwslgi llydmvcgdi
241    pfehdeeik  gqvffrqtvs secqhlikwc lslrpsdrps feeirnhpwm qgdllpqaas
301    eihlhlslspg ssk
```

Fig. 2a)

```
1   cccacgcgtc cgcagagtgc cagcagctga tccggtggtg cctgtccctg cggccctcag
61  agcggccgtc gctggatcag attgcggccc atccctggat gctgggggct gacgggggag
121 ccccggagag ctgtgacctg cggctgtgca cctcgaccc tgatgacgtg gccagcacca
181 cgtccagcag cgagagcttg tgaggagctg cacctgactg ggagctaggg gaccacctgc
241 cttggccaga cctgggacgc cccagaccc tgactttttc ctgcgtgggc cgtctcctcc
301 tgcggaagca gtgacctctg accctgggtg accttcgctt tgagtgcctt ttgaacgctg
361 gtcccgcggg acttggtttt ctcaagctct gtctgtccaa agacgctccg gtcgaggtcc
421 cgctgcccct ggggtggatac ttgaacccca gacgcccctc tgtgctgctg tgtccggagg
481 cggccttccc atctgcctgc ccaccggag ctctttccgc cggcgagggg tcccaagccc
541 acctcccgcc ctcagtcctg cgggtgtgct ctgggcacgt cctgcacaca caatgcaagt
601 cctggcctcc gcgcccgcgc gccacgcga gccgtaccgc ccgccaactc tgttatttat
661 ggtgtgacct cctggaggtg ccctcgccc accggggcta tttattgttt aatttatttg
721 ttgaggttat ttcctctgag cagtctgcct ctccaagcc ccaggggaca gtggggaggc
781 aggggagggg gtggctgtgg tccagggacc ccaggccctg attcctgtgc ctggcgctctg
841 tcctggcccc gcctgtcaga agatgaacat gtatagtggc taacttaagg ggagtgggtg
901 accctgacac ttccaggcac tgtgcccagg gtttgggttt taaattattg actttgtaca
961 gtctgcttgt gggctctgaa agctgggggt gggccagagc ctgagcggtt aatttattca
1021 gtacctgtgt ttgtgtgaat gcggtgtgtg caggcatcgc agatgggggt tctttcagtt
1081 caaaagtgag atgtctggag atcatatttt tttatacagg tatttcaatt aaaatgtttt
1141 tgtacataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa
```

Fig. 2 b)

Fig. 2 c)

```

1      cgctcggcca gctgccgtct acgggcttcc gcgcggccac cgggcaactg cgccgcgcgg
61     ctgccccact gagegctcgg cctcggggcc gtgggatccg ccgcgctgtc tgcggtcagg
121    aagaccgccc tcccgcgtcc gtgccggacg ggtcagaggc ggcgccgcac gcgaggccac
181    ccgcgatgct gctgtccaag ttccggctccc tggcgcacct ctgcgggcct ggccggctgg
241    accacctccc agtgaagatc ctacagccag ccaaggcgga caaggagagc ttcgagaagg
301    tgtaccaggt gggcgccgtg ctccggcagcg gcggcttcgg cacggctctac gcgggcagcc
361    gcatcgccga cggactcccg gtggctgtga agcacgtggt gaaggagcgg gtgaccgagt
421    ggggcagctc cggcggaatg gccgtgcccc tggaggtggt gctgctgcgc aagggtggcg
481    cggcgggcgg cgccgcgcggc gtcacccgcc tgctggactg gttcgagcgg cccgacggct
541    tcctgctggt gctggagcga cccgagccgg cacaggacct cttcgacttc atcactgaac
601    gcggcgccct ggacgagcct ctggtctgtc gcttcttcgc gcaggtgtc gcgcgtgtgc
661    ggcaactgcca caattgtggg gtcgtgcacc gcgacatcaa ggacgagaac ctgctggtgg
721    acttgcgctc gggcgagctg aagctcatcg acttcggctc gggcgcggtg ctcaaggaca
781    cggctctacac tgactttgat ggcacccgtg tgtacagccc cccagagtgg atccgggtac
841    tgcgatatca cggcggtct gccactgtgt ggtctctggg tgtactgtc tacgacatgg
901    atgtggggga cattcccttt gagcaggatg aggagatctt gcgcggcagg ctctttttcc
961    ggaggagggt ctccccagag tgccagcagc ttattgagtg gtgtctctcc ctgcggccct
1021   cagagaggcc ctgcctggac caaattgtct cccatccctg gatgctgggg acagagggca
1081   gcgttccaga gaactgtgac cttcggctct gtgccctgga tactgatgac ggagccagta
1141   ccacttccag cagtgaagc ttgtgaggag gaggaggggc ctggactcca cactgggggc
1201   ctgggctcag cctagccagc cctctcccag aatgaacatt ttctgcctgg gatgtctct
1261   gcaaaagcag tgacctctga cccctggtga cctttgctct cggcacccgg cctgtttct
1321   ttgctttgag tgcccttttg aacgctgtc cacagggcct gggttttctt gagctcttct
1381   gtccaaagat ggctgcgggc taagcaaggt cccgcctgcc ctgggtggat acttgaaccc
1441   gagaccctac cctgctgtc catcttgctg cagccttcct gaccaagtgt gtttgacatg
1501   gagcgccctg tgggtgcccac ctccaaccct ccagtctcct ggtcttcgtc tgggcatgtc
1561   tgcacaagca atgcaacgct gggccactgc tgcccgcctg cctccctggc accgcacgca
1621   acgagcgtgc cacggctctct tatttatggt gtgatcacc tggagggcgc ccctgccctg
1681   ctggggctat ttattgttta atttatttgc tgaggttact tcctccaagc aaccaccttc
1741   tccaggcccc tgggggtgtt aggaaagcca aggggtggccg ttcagtccac agacggcatc
1801   ctggttcctg cacctgcagt aggtccctaa ccccatgtt gtgggaggag gaatttgtac
1861   agtggctaata ttaaggggag tgggagacct tgtcaccctg ggcactctgc gctggggagg
1921   gggtttaaat tattgacct gtacagtctg cttgctggct ctgaaagctg ggggtggggga
1981   cagagtctca agcccttaat ttattttagc aactgtgttc tgtgacctg gtgtgagtag
2041   gcatcagggg tgggggtgta taagttcaaa agtgtgaaat gtctggagat catatttttt
2101   atacagggtat ttcaattaaa tgttttggta tat

```

Fig. 2 d)

```
1      mllskfgsla hlcgpggvdh lpvkilqpak adkesfekvy qvgavlgsgg fgtvyagsri
61     adglpvavkh vkervtewg slggmavple vllrkvgaa ggargvirll dwferpdgfl
121    lvlerpepaq dlfdfiterg aldeplarrf faqvlaavrh chncgvvhrd ikdenllvdl
181    rsgelklidf gsgavlkdtv ytdfdgtrvy sppewiryhr yhgrsatvws lgvllymvc
241    gdipfeqdee ilrgrlffrr rvspecqqli ewclslrpse rpsldqiaah pwmlgtegs
301    pencdlrlca ldtddgastt sssesl
```

Fig. 2e)

```
1      gcagggcggg tgagagcgcc gtgaaagccg cggaacgccc tgcacctccg cgactctact
61     acggcaagct agtccggacg ggtcgtcgtc cccgcgcgcc accagccctt ggtgaaacga
121    cagggagcgt ccggcttccc cagcaccgcc ctgcgagact caaaacagcc acaccgaaa
181    gcgagcctcg ggcggaagga ggcggagctt caggcggccc cgctcccgcg gaaggataca
241    catctccgtg gtccaaaacc ccggggcgag gcgccggggg cgtgtgagct gctcgccag
301    ctgccgtcta cgcgctttcg cgcggccacc gggcaactgc gccgcgcggc tgccccgctg
361    agcgtcggc ctcggggccg tgggatccgc cgcgctgtct gcggtcagga agaccgcct
421    cccgcgtcct tgccggacgg gtcagaggcg gcaccgcacg cgaggccacc cgcgatgctg
481    ctgtccaagt tcggtccctt ggcgcacetc tgcgggcctg gcggcgtgga ccacctccca
541    gtgaagatcc tacagccagc caaggctgac aaggagagct tcgagaaggt gtaccaggtg
601    ggcgcggtgc tgggcagcgg cggcttcggc acggtctacg cgggcagccg catcgccgac
661    ggactcccgg tggctgtgaa gcacgtggtg aaggagcggg tgaccgagtg gggcagctct
721    ggcggagtg gctgcccctt ggagtggtg ctgctgcgca aggtggggcg ggcgggcggc
781    gcgcgcggcg tcatccgctt gctggactgg ttcgagcggc ccgacggctt cttgttgggtg
841    ctggagcgac ccgagccggc acaggacctc ttcgacttca tctactgaac aggcgccttg
901    gacgagccgc tggcgcgtcg cttcttcgcg caggtgcttg ccgctgtgcg gactgccac
961    aattgtgggg tcgtgcaccg cgacatcaag gacgagaacc tgctggtgga cctgcgctcg
1021   ggagagctga agctcatcga cttcggctcg ggcgcggtgc tcaaggacac ggtctacact
1081   gactttgatg gcacccgtgt gtacagcccc ccagagtgga tccgatatca ccgatatcac
1141   gggcgggtcg ccactgtgtg gtctctgggt gtactgctct acgacatggt gtgtggggac
1201   attccccttg agcaggatga ggagatcttg cgcggcaggc tcttttccg gaggagggtc
1261   tccccagagt gccagcagct tattgagtgg tgtctctccc tgaggccctc agagaggccc
1321   tccctggacc aaattgctgc ccacccctgg atgctgggga cagaggggag cgttccagag
1381   aactgtgacc ttcggctttg tgccctggat actgacgacg gagccagtac cacttccagc
1441   agtgagagct tgtgaggagg agaagggggc tgggctcggc ctagccagcg ctctcccaga
1501   attgaacact ttctgcctgg gatgtctgct gcaaaagcag tgacctctga cccctggtga
1561   cctttgctct cggcaccggg cctgtttcct ttgctttgag tgctttttg aacgctgctc
1621   cacagggcct gggttttctt gagctcttct gtccaaagat ggctgagggc taagcaaggt
1681   cctgccctgg gtggatactt gaaccagaga tcccgaccct gctgctccat ctcaggaggc
1741   agccttcctg accaagtgtg tttgacatgg agcgcctgt ggtgccacc tccaacctc
1801   cagtctcctg gtgttcactt gggcatgtct gcacaagcaa tgcaacgctg ggccactgct
1861   gcccgctgc ctccccggca cggcacggct ccgcacgcaa cctaagcgtg ccaccacggt
1921   ctcttattta tgggtgtgatc accctggagg gcgcccccg cctgctgggg ctattttattg
1981   tttaatattat ttgctgaggt tcctccaagc aaccaccttc tccaggcccc tggggtgttg
2041   aaagtcaaat gtggctgttg agtccacaga ccccatcct aattcctgca cctggaggag
2101   ttccccaacc cccgtgtttg cgggaggaag catttgtaca gtggctaatt taaggggagt
2161   gggagaccct gtcaccctga gcactctgcg ctggggaggg gtttaaatta ttgaccttgt
2221   acagtctgct tgctggctct gaaagctggg gttgggggac agagtctcaa gcccttaatt
2281   tatttttagca gctgtgtttc tgtgaccctg gtgtgactaa gcatcagggg tggggttgta
2341   taagttcaaaa agtgtgaaat gtctgaagat catatTTTTT atacaggtat ttcaattaaa
2401   tgttttggta tataatggaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa
```

Fig. 2f)

1	MLLSKFGSLA	HLCGPGGVDH	LPVKILQPAK	ADKESFEKVY	QVGAVLGSGG	FGTVYAGSRI
61	ADGLPVAVKH	VVKERVTEWG	SLGGVAVPLE	VLLLRKVGAA	GGARGVIRLL	DWFERPDGFL
121	LVLERPEPAQ	DLFDFITERG	ALDEPLARRF	FAQVLAAVRH	CHNCGVVHRD	IKDENLLVDL
181	RSGELKLIDF	GSGAVLKDTV	YTDFDGTRVY	SPPEWIRYHR	YHGRSATVWS	LGVLLYDMVC
241	GDIPFEQDEE	ILRGRLFFRR	RVSPECQQLI	EWCLSLRPSE	RPSLDQIAAH	PWMLGTEGSV
301	PENCDLRLCA	LDTDDGASTT	SSSESL			

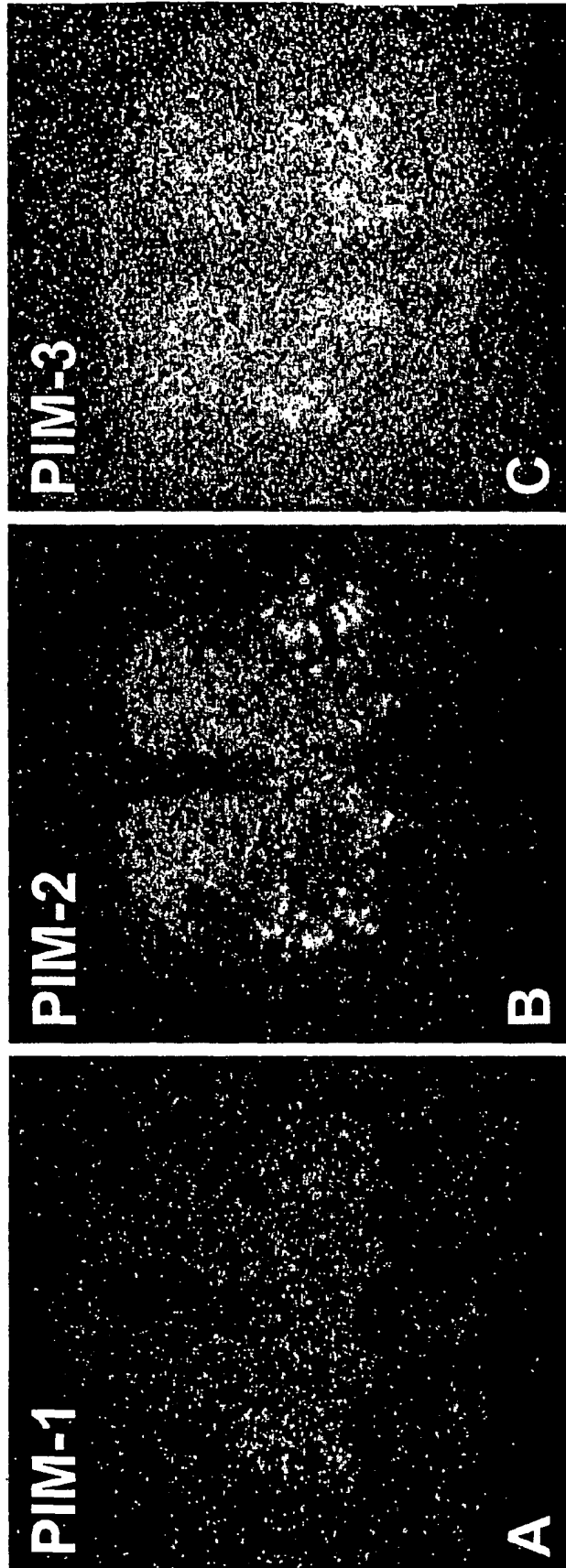


Fig. 3: mRNA-Expression der PIM-Kinasen im Lumbalmark der adulten Ratte

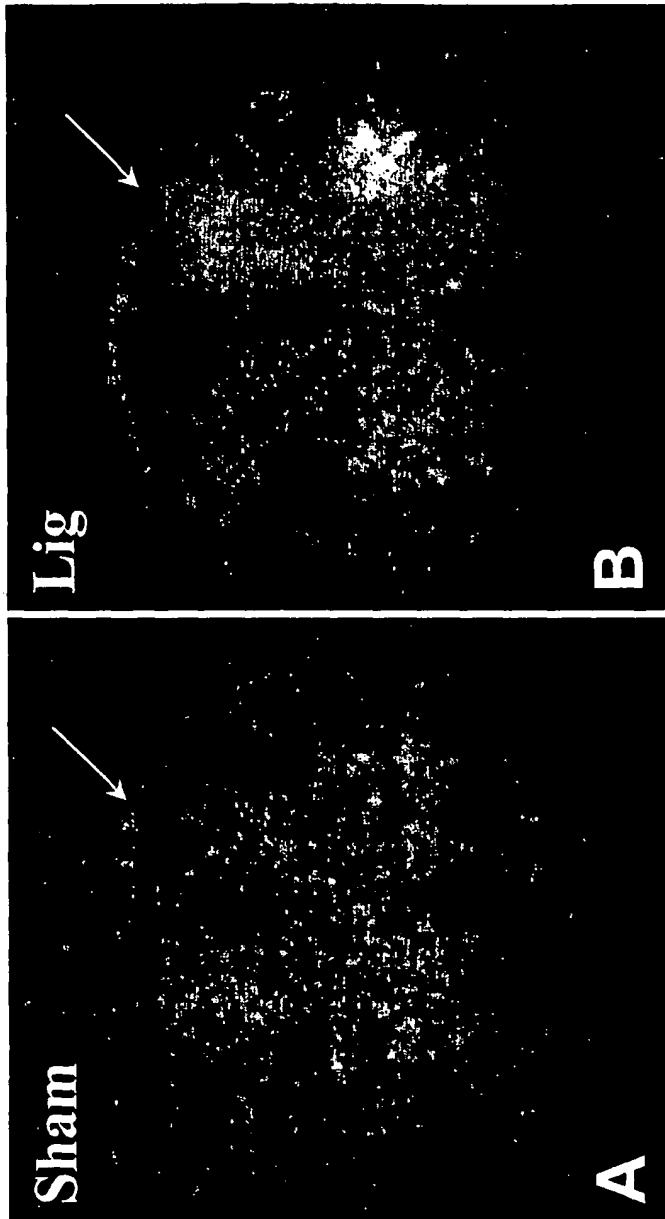
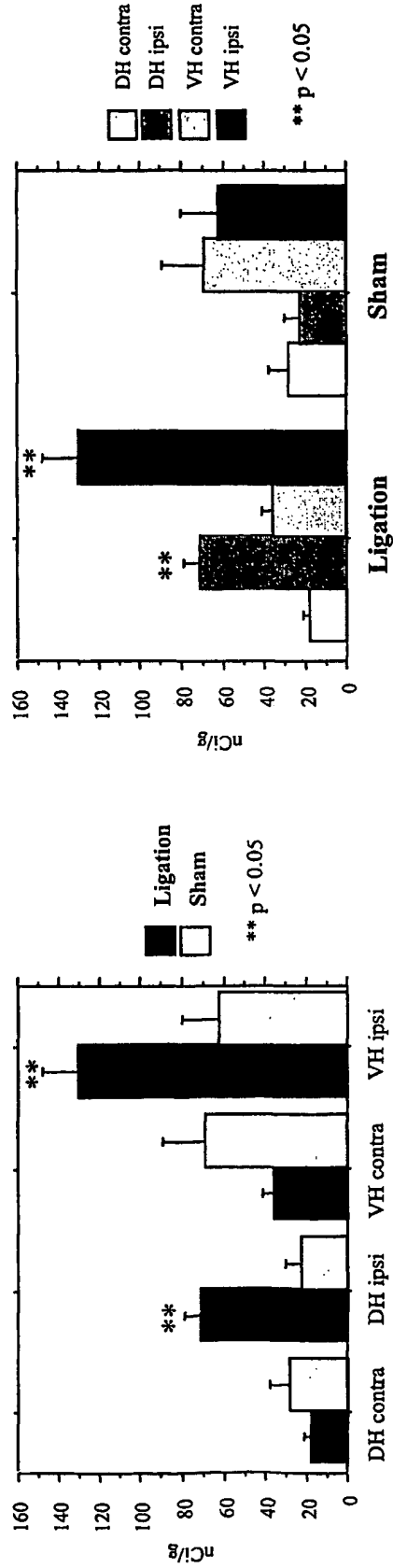


Fig. 4: Veränderungen der PIM-1 Genexpression im Rückenmark (L5) nach Ischiadicus-Ligatur (Bennett)

Fig. 5: PIM-1 mRNA-Spiegel im Lumbalmark (L5) nach Bennett-Ligatur

- Quantitative Auswertung der in situ-Hybridisierungsergebnisse -



Gruppe	Region	Messungen	Mittelwert (nCi/g)	SD	SEM
Ligation	DH contra	17	17,95	14,89	3,61
Ligation	DH ipsi	17	71,61	30,05	7,29
Ligation	VH contra	17	35,19	22,37	5,43
Ligation	VH ipsi	17	129,83	74,83	18,15
Sham	DH contra	9	27,64	29,68	9,89
Sham	DH ipsi	9	21,94	24,52	8,17
Sham	VH contra	9	69,30	57,77	19,26
Sham	VH ipsi	9	62,33	52,31	17,44

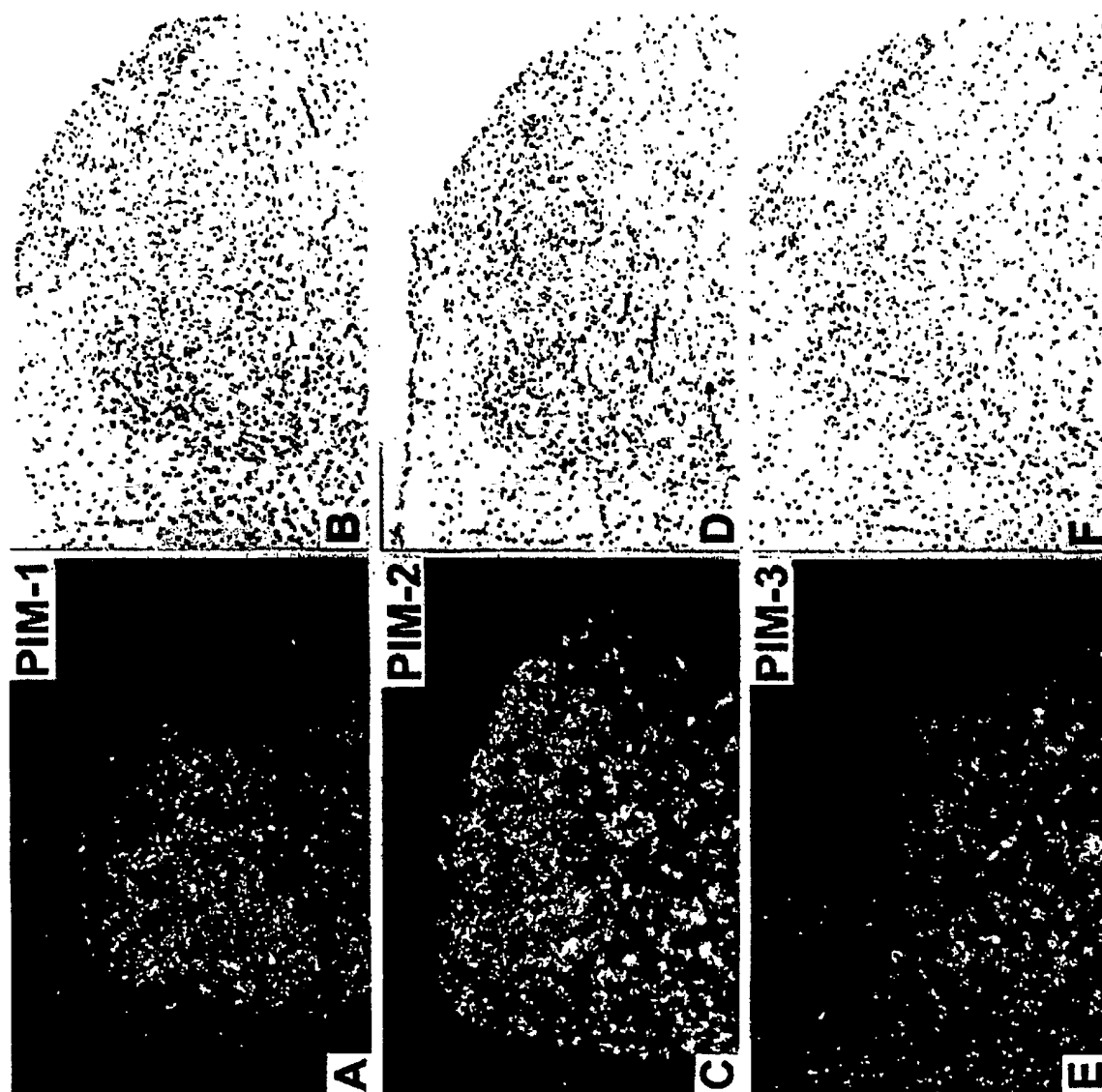


Fig. 6

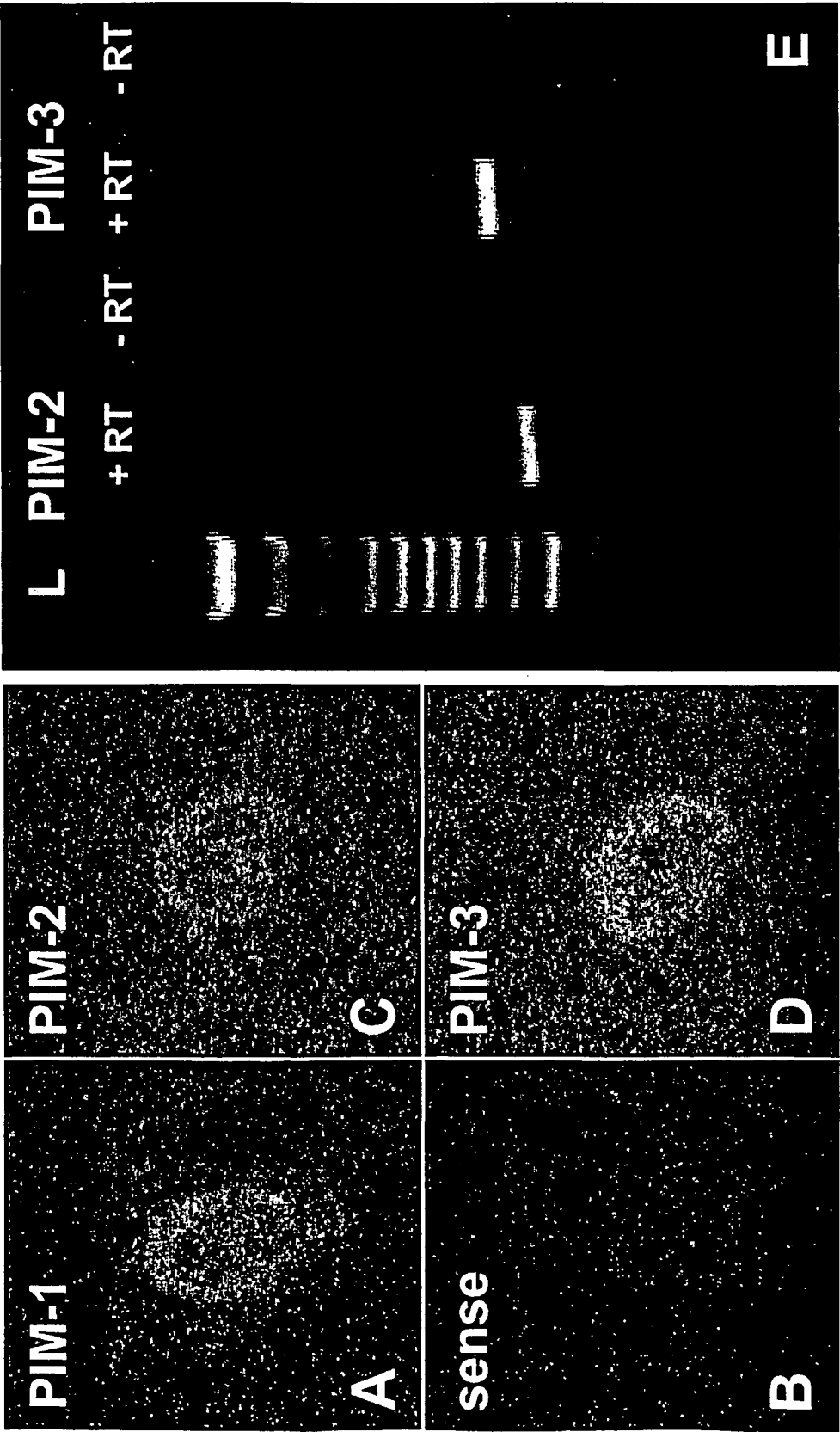


Fig. 7: mRNA-Expression der PIM-Kinasen im Spinalganglion

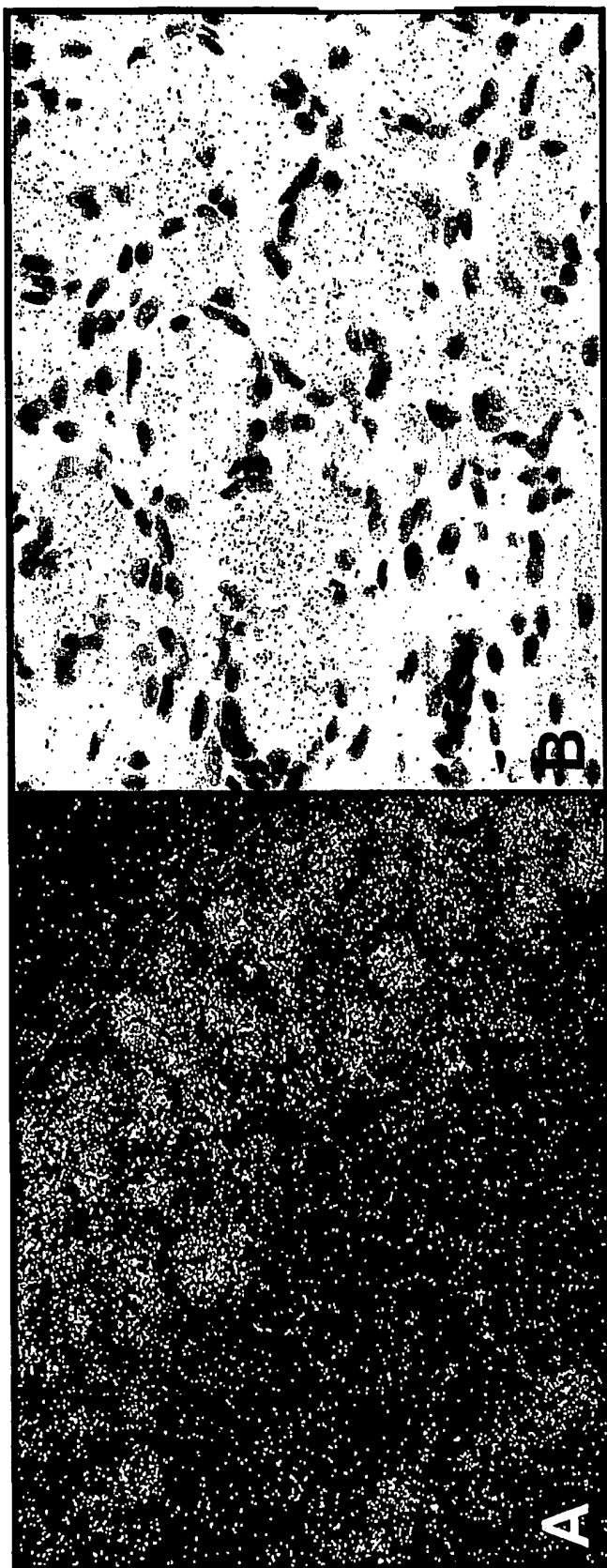
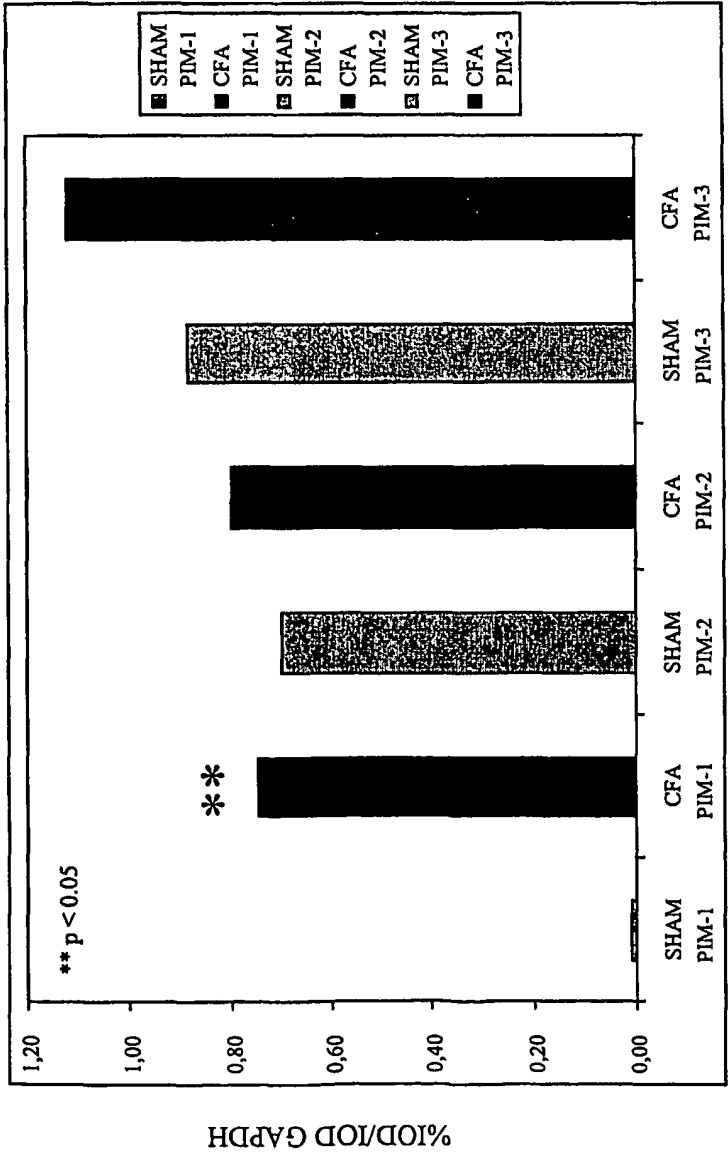


Fig. 8: Lokalisation der PIM-1 Genexpression im Spinalganglion (L6) der Ratte mit *in situ*-Hybridisierung

Fig. 9: Veränderungen der PIM-1, PIM-2 und PIM-3 mRNA-Spiegel
im Spinalganglion L6 nach bilateraler CFA-Arthritis
-Semi-quantitative RT-PCR Analyse -



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/093173 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: **G01N 33/573**,
C12N 9/12, C07K 16/40, C12N 15/85

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/05234

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Mai 2002 (13.05.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 23 055.9 11. Mai 2001 (11.05.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): GRÜNENTHAL GMBH [DE/DE]; Zieglerstrasse 6,
52078 Aachen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEIHE, Eber-
hard [DE/DE]; Am Grassenberg 7 a, 35037 Marburg
(DE). SCHÄFER, Martin, K.-H. [DE/DE]; Unter dem
Gedankenspiel 48, 35041 Marburg (DE). GILLEN,
Clemens [DE/DE]; Albert-Einstein-Str. 115, 52076
Aachen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts: 28. August 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/093173 A3

(54) Title: SCREENING METHOD USING PIM1-KINASE OR PIM3-KINASE

(54) Bezeichnung: SCREENINGVERFAHREN MIT PIM1-KINASE ODER PIM3-KINASE

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting pain-associated substances using PIM1-kinase or PIM 3-kinase and the use of thus identified compounds, in addition to antibodies and anti-sense nucleotides against PIM1-kinase or PIM-3-kinase in medicaments and diagnostic agents and in pain therapy.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung schmerzrelevanter Substanzen unter Verwendung der PIM-1- oder PIM-3-Kinase und die Verwendung dadurch identifizierter Verbindungen sowie Antikörper und Antisensenukleotiden gegen PIM-1- oder PIM-3-Kinase in Arzneimitteln und Diagnostika sowie in der Schmerztherapie.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/05234

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/573 C12N9/12 C07K16/40 C12N15/85

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 143 540 A (KAPELLER ROSANA) 7 November 2000 (2000-11-07) column 30, line 4 -column 34, line 32 ---	1-11,23, 24,27, 28,32,43
X	WO 00 75667 A (KINETEK PHARMACEUTICALS INC ;WANG SHISEN (CA); ZHANG ZAIHUI (CA);) 14 December 2000 (2000-12-14) abstract claim 1 ---	1-11,23, 24,27, 28,32,43
X	EP 0 911 391 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 28 April 1999 (1999-04-28) claim 6 --- -/--	1-11,23, 24,27, 28,32,43

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 April 2003

Date of mailing of the international search report

15 JUL 2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/05234

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 26054 A (SCHLESSINGER JOSEPH ;LEV SIMMA (US); SUGEN INC (US); UNIV NEW YORK) 18 June 1998 (1998-06-18) abstract claims 3,5,6	1-11,23, 24,27, 28,32,43
A	--- FELDMAN JONATHAN D ET AL: "KID-1, a protein kinase induced by depolarization in brain" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 273, no. 26, 26 June 1998 (1998-06-26), pages 16535-16543, XP002203188 ISSN: 0021-9258 abstract -& DATABASE SWISS-PROT [Online] Entry name: PIM3_RAT, Database accession no. 070444 XP002239699 abstract -----	1-11,23, 24,27, 28,32,43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP02/05234

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplementary sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-11, 23, 24, 27, 28, 32, 43

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.2

Claims: 23, 24 (in full) and 25-28, 31-42 (in part)

The current Claims 23, 24 (in full) and 25-28 and 31-42 (in part, insofar as they relate to Claims 23 and 24) relate to compounds characterised by a desirable characteristic or property, namely that they can be identified by a method as per Claims 1-11 and 43.

The claims therefore encompass all compounds that have this characteristic or property, but the application provides support by the description (PCT Article 5) for no such products. In the present case, the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the compounds by their pharmacological effect. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Therefore the search was directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported or disclosed in the above sense, that is the screening methods as per Claims 1-11 and 43.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely:

1. Claims: 1-11, 23, 24, 27, 28, 32, 43

Methods for locating substances which bind to PIM-1 or PIM-3 kinases.

2. Claims: 12-22, 25, 26, 29-31, 33-42

Polynucleotide as per Figure 2a) and protein that can be derived therefrom, vectors, etc.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/05234

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6143540	A	07-11-2000	US 6383791 B1	07-05-2002
			US 2002115120 A1	22-08-2002

WO 0075667	A	14-12-2000	AU 4906300 A	28-12-2000
			WO 0075667 A1	14-12-2000
			CA 2373069 A1	14-12-2000
			US 6548266 B1	15-04-2003

EP 0911391	A	28-04-1999	CA 2248170 A1	24-04-1999
			EP 0911391 A2	28-04-1999
			JP 11235185 A	31-08-1999
			JP 2002233365 A	20-08-2002

WO 9826054	A	18-06-1998	AU 5596998 A	03-07-1998
			EP 0948604 A2	13-10-1999
			JP 2001505779 T	08-05-2001
			WO 9826054 A2	18-06-1998
			US 2003119067 A1	26-06-2003
			US 2002048782 A1	25-04-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/05234

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/573 C12N9/12 C07K16/40 C12N15/85

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 143 540 A (KAPELLER ROSANA) 7. November 2000 (2000-11-07) Spalte 30, Zeile 4 -Spalte 34, Zeile 32 ---	1-11,23, 24,27, 28,32,43
X	WO 00 75667 A (KINETEK PHARMACEUTICALS INC ;WANG SHISEN (CA); ZHANG ZAIHUI (CA);) 14. Dezember 2000 (2000-12-14) Zusammenfassung Anspruch 1 ---	1-11,23, 24,27, 28,32,43
X	EP 0 911 391 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 28. April 1999 (1999-04-28) Anspruch 6 --- -/-	1-11,23, 24,27, 28,32,43

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

29. April 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15 JUL 2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WO 98 26054 A (SCHLESSINGER JOSEPH ;LEV SIMMA (US); SUGEN INC (US); UNIV NEW YORK) 18. Juni 1998 (1998-06-18) Zusammenfassung Ansprüche 3,5,6</p> <p>---</p>	<p>1-11,23, 24,27, 28,32,43</p>
A	<p>FELDMAN JONATHAN D ET AL: "KID-1, a protein kinase induced by depolarization in brain" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 273, Nr. 26, 26. Juni 1998 (1998-06-26), Seiten 16535-16543, XP002203188 ISSN: 0021-9258 Zusammenfassung -& DATABASE SWISS-PROT [Online] Entry name: PIM3 RAT, Database accession no. 070444 XP002239699 Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	<p>1-11,23, 24,27, 28,32,43</p>

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-11, 23, 24, 27, 28, 32, 43

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 23, 24 (vollständig nicht) und 25-28, 31-42 (teilweise nicht)

Die geltenden Patentansprüche 23, 24 (vollständig) und 25-28 und 31-42 (teilweise, insoweit sie sich auf die Ansprüche 23 und 24 beziehen) beziehen sich auf Verbindungen, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich daß sie durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1-11 und 43 identifiziert werden können.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Verbindungen, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT für keine solche Verbindungen liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Verbindungen über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Screeningverfahren gemäß den Ansprüchen 1-11 und 43.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-11, 23, 24, 27, 28, 32, 43

Verfahren zur Auffindung von Substanzen die an PIM-1 oder PIM-3-Kinasen binden

2. Ansprüche: 12-22, 25, 26, 29-31, 33-42

Polynukleotid gemäss Abb. 2a), und davon ableitbare Proteine, Vektoren, usw.

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/05234

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6143540	A	07-11-2000	US 6383791 B1	07-05-2002
			US 2002115120 A1	22-08-2002
WO 0075667	A	14-12-2000	AU 4906300 A	28-12-2000
			WO 0075667 A1	14-12-2000
			CA 2373069 A1	14-12-2000
			US 6548266 B1	15-04-2003
EP 0911391	A	28-04-1999	CA 2248170 A1	24-04-1999
			EP 0911391 A2	28-04-1999
			JP 11235185 A	31-08-1999
			JP 2002233365 A	20-08-2002
WO 9826054	A	18-06-1998	AU 5596998 A	03-07-1998
			EP 0948604 A2	13-10-1999
			JP 2001505779 T	08-05-2001
			WO 9826054 A2	18-06-1998
			US 2003119067 A1	26-06-2003
			US 2002048782 A1	25-04-2002

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.